Untersuchungen zur Struktur von Proteinen in Lösung

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gottfried Schneider

aus Laichingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0115

Untersuchungen zur Struktur von Proteinen in Lösung

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gottfried Schneider

aus Laichingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1970

Dekan:	Prof. Dr. W. Rüdorff
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Dozent Dr. H. Hagenmaier

Gedruckt mit Unterstützung des
Kultusministeriums Baden-Württemberg

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinen

Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Mai 1968 bis Februar 1970 im Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Ernst Bayer

danke ich aufrichtig für die Stellung des Themas, für wertvolle Anregungen, für die großzügige Unterstützung und das jederzeit gezeigte Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dozent Dr. Hanspaul Hagenmaier

möchte ich für viele Ratschläge und Diskussionen sehr herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A) Einleitung und Problemstellung 1

B) Allgemeiner Teil 5

I. Circulardichroismus von Poly-α-L-Aminosäuren 6

a) Poly-L-Glutaminsäure 6

b) Poly-L-Lysin 8

c) Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen prozentualen Anteilen an α-Helix, β-Struktur und Random coil 13

II. CD-Spektren von Pottwalmetmyoglobin und Pottwal-Apomyoglobin 21

III. CD-Spektren von Ferredoxinen und Apoferredoxinen 25

a) Ferredoxin und Apoferredoxin aus Clostridium pasteurianum 26

b) Ferredoxin und Apoferredoxin aus Spinat 26

IV. ^{19}F-NMR-Untersuchungen der Strukturen höherer Ordnung von Proteinen und Poly-α-L-Aminosäuren 30

V. Konformation, Stabilität, Denaturierung und Renaturierung von Pottwal-Apomyoglobin 32

a) Behandlung von Apomyoglobin mit Harnstoff und Guanidinhydrochlorid 35

b) Behandlung von Apomyoglobin mit Natriumdodecylsulfat 38

c) Behandlung von Apomyoglobin mit Trifluoressigsäure und bromwasserstoffhaltiger Trifluoressigsäure 40

d) Apomyoglobin in organischen Lösungsmitteln 41

Seite

VI. Selektive Spaltung von Apomyoglobin mit Bromcyan und Untersuchung der Rekombinationsfähigkeit der erhaltenen Bruchstücke 42

VII. Rekombinationsfähigkeit des mit Kaliumperjodat oxydierten Apomyoglobins 45

C) Experimenteller Teil

I. Messung des Circulardichroismus 46

II. Bestimmung der Proteinkonzentration 47

III. Darstellung von Pottwal-Apomyoglobin aus Pottwal-metmyoglobin 48

IV. Bromcyanspaltung von Apomyoglobin 50

V. Isolierung von Ferredoxinen 52

a) Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum 52
b) Ferredoxin aus Spinat 53

VI. Darstellung von Apoferredoxinen 53

a) Aus Clostridienferredoxin 53
b) Aus Spinatferredoxin 55

D) Zusammenfassung 56

E) Literaturverzeichnis 58

A) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Neben der Aufklärung der Primärstruktur, d.h. der Aminosäuresequenz von Proteinen, fanden in den letzten Jahren auch Untersuchungen, die die Erforschung der Strukturen höherer Ordnung [+], d.h. die räumliche Lage und Fixierung aller Atome der Makromoleküle, zum Ziel hatten, großes Interesse.

Starke Beachtung fanden vor allem die Arbeiten von J.C. KENDREW [1 - 4] und Mitarbeitern, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die räumliche Anordnung aller Nichtwasserstoffatome des Myoglobins aus Pottwal (Physeter catodon) erhalten konnten. Das auffallendste Ergebnis waren dabei eine Anzahl schraubenförmig gewundener, 20 - 40 Å langer Stränge (Abb. 1), deren Atomanordnung genau der von L. PAULING und R.B. COREY [5, 6] 1951 vorausgesagten rechtsdrehenden α-Helix entsprach.

Die Röntgenstrukturanalyse ergibt jedoch nur die Struktur von Proteinen im kristallinen Zustand. Es war daher sehr wichtig, auch die Struktur von Proteinen in Lösung zu untersuchen, und wenn möglich mit den Ergebnissen der Kristallographie zu korrelieren, da die globulären Proteine fast ausschließlich ihre biologische Funktion im gelösten Zustand ausüben. P. URNES und P. DOTY [7] konnten dann 1961 zeigen, daß es mit Hilfe der Optischen Rotationsdispersion (ORD) gelingt, die Konformation von Polypeptiden in der α-Helix-Form und in der ungeordneten, sog. Random coil-Form, zu unterscheiden. Gleichen Informationsgehalt be-

---

[+] Unter der Primärstruktur wird die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette verstanden. Die Sekundärstruktur beschreibt die Anordnung dieser Kette durch Drehung und Biegung zu einer geordneten Struktur z.B. einem zylindrischen Strang. Das Zusammenfalten dieses Stranges zu kompakteren räumlichen Gebilden ergibt die Tertiärstruktur. Außerdem können zwei oder mehrere Polypeptidstränge zu größeren und komplexeren Einheiten kombinieren (Quartärstruktur).

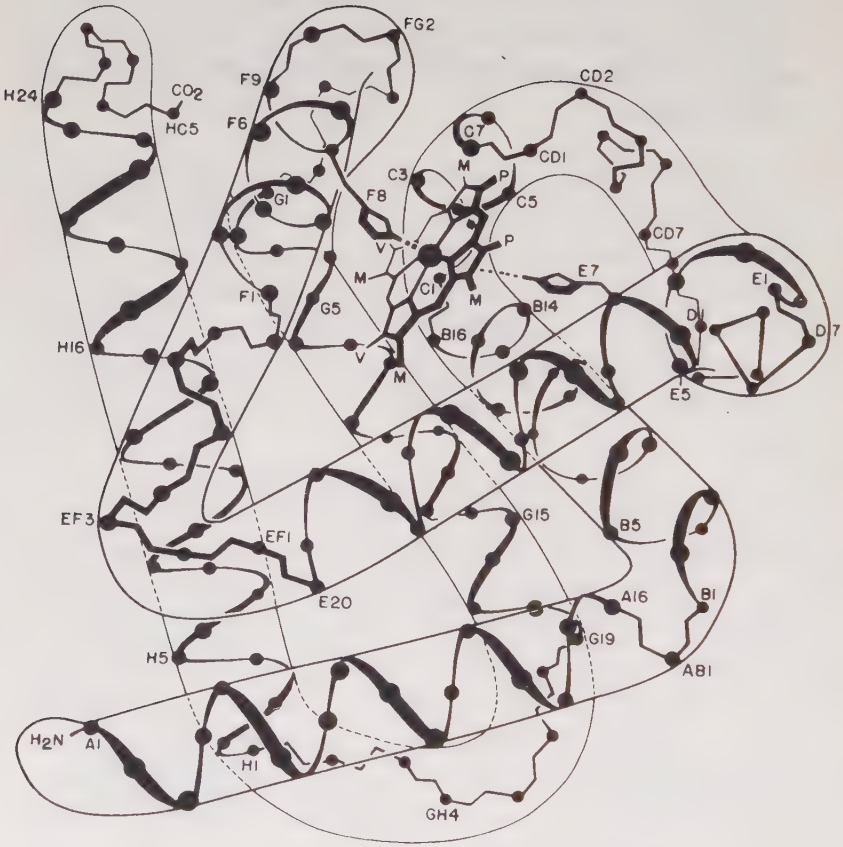


Abb. 1: Pottwal-Metmyoglobin in der von J. C. KENDREW und Mitarbeitern [3] aus der Röntgenstrukturanalyse (2 Å) erhaltenen räumlichen Anordnung. Die dunklen Punkte stellen die α-Kohlenstoffatome dar.

sitzt die Messung des Circulardichroismus (CD), die aus meßtechnischen Schwierigkeiten etwas später erfolgte. (G. HOLZWARTH, W. B. GRATZER und P. DOTY [8]). Von besonderer Bedeutung war dabei die Tatsache, daß diese Autoren einen α-Helixanteil von 75-77 % im Pottwalmyoglobin gefunden hatten, was genau dem von J. C. KENDREW gefundenen Wert entspricht. Daraus wurden zwei bedeutsame Folgerungen gezogen:

I. Die Konformation von Myoglobin wird beim Lösen der Proteinkristalle nicht verändert.

II. ORD und CD sind anwendbare Methoden zur Untersuchung der Sekundärstruktur [+)] und unter Umständen der Tertiärstruktur [+)] von Proteinen.

Neuere Untersuchungen am Pottwalmetmyoglobin (S. C. HARRISON und E. R. BLOUT [9]; E. BRESLOW und Mitarbeiter [10]) ergaben allerdings einen niedrigeren Helixanteil als in den ersten Arbeiten angenommen wurde. Doch zeigte die genauere Analyse der Elektronendichtekarte, daß Teile der Helixstränge stärker gedehnt oder anderweitig gestört sind als sie es in einer idealen oder perfekten rechtsdrehenden α-Helix sein sollten (B. ASKONAS und Mitarbeiter [11]; G. NEMETHY [12] und Mitarbeiter). Ein Helixwert von 60 - 70 % für Pottwalmetmyoglobin scheint daher eher richtig zu sein.

Bei der Berechnung von Helixwerten wurde in den angegebenen Arbeiten die Elliptizität bei 222 nm mit den entsprechenden Θ-Werten von Poly-α-L-Aminosäuren verglichen, bei denen bekannt ist, daß sie unter bestimmten Bedingungen in 100%-iger Helixform vorliegen. Es wurde jedoch schon darauf hingewiesen [13, 14], daß gerade die Bande bei 222 nm unter Umständen falsche Werte liefern kann. Eine exaktere Bestimmung

sollte aber durch den Vergleich des gesamten CD-Spektrums im Spektralbereich der Peptidchromophore mit theoretisch berechneten Kurvenscharen, die verschieden hohe Anteile an α-Helix, β-Struktur und Random coil enthalten, möglich sein. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten daher diese Kurvenscharen bestimmt werden, um daraus die Sekundärstruktur sowohl des Pottwalmetmyoglobins und Apomyoglobins als auch die verschiedener Ferredoxine und Apoferredoxine zu ermitteln.

Neben der Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur ist jedoch die Frage nach der Entstehung dieser Strukturen höherer Ordnung von großer Bedeutung. Genetische Überlegungen über die Biosynthese von Proteinen ergeben die These, daß die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, alle Informationen für den Aufbau der räumlichen Anordnung enthält. Diese These ist heute vielfach anerkannt und vor allem von C. B. ANFINSEN und Mitarbeitern [15, 16] in verschiedenen Experimenten an der Ribonuklease untermauert worden. Eine endgültige Bestätigung dieser biologisch außerordentlich wichtigen These kann jedoch nur die chemische Synthese eines Proteins mit ausgeprägter Sekundärstruktur ergeben. Im Hinblick auf eine solche Synthese sollte im zweiten Teil dieser Arbeit Stabilität, Denaturierung und Renaturierung von Apomyoglobin untersucht werden.

B) ALLGEMEINER TEIL

Die Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen durch Messung des Circulardichroismus und Vergleich mit den entsprechenden Ellipticitätswerten $[\theta]$ von Poly-α-L-Aminosäuren hat in einigen Fällen nur unbefriedigende Ergebnisse ergeben. Die Abweichungen der CD-Spektren von Proteinen von denen der entsprechenden Modellsubstanzen werden vor allem auf den Einfluß der Tertiärstruktur zurückgeführt (J. H. STRAUSS und Mitarbeiter [17]). Außerdem sind bei Proteinen vor allem in den nicht α-Helix-Gebieten, außer den Faltblattstrukturen (β-Struktur) und der Random coil-Form weitere Strukturelemente zu diskutieren, deren Einfluß auf das CD-Spektrum noch nicht oder nur unvollständig bekannt sind. So ist aus der Berechnung von $[\theta]$-Werten bekannt, daß die sog. π - und die 3_{10}-Helix noch in Bereichen so großer Stabilität liegen, daß sie aus thermodynamischen Gründen für die Konformation lokaler Gebiete von globulären Proteinen in Betracht gezogen werden können (J. A. SCHELLMAN und C. SCHELLMAN [18]).

Größere Abweichungen liegen allerdings auch in der bis jetzt einzig angewandten Methode begründet, gefundene $[\theta]$-Werte mit denen von Modellsubstanzen zu vergleichen, von denen bekannt ist, daß sie unter bestimmten Bedingungen in 100%-iger α-Helix-Form vorliegen. Vor allem werden dazu Poly-L-Glutaminsäure bei p_H 4,0 und Poly-L-Lysin bei p_H 11,75 verwendet.

Bessere Ergebnisse sind natürlich durch den Vergleich der gefundenen CD-Spektren mit Spektren von Modellsubstanzen zu erwarten, die entsprechende Anteile α-Helix, β-Struktur und Random coil enthalten. Da diese CD-Spektren aber experimentell direkt nicht meßbar sind, wurden sie durch Linearkombination der CD-Spektren der α-Helix-Form (Poly-L-Glutaminsäure in 0,1 n NaF-Lsg. bei p_H 4,0), der Random

coil-Form (Poly-L-Glutaminsäure in 0,1 n NaF-Lsg. bei p_H 7,9) und der β-Struktur (Poly-L-Lysin, wässr. Lsg. p_H 11,75 ca. 60 min auf 50°C erhitzt) berechnet.

I. Circulardichroismus von Poly-α-L-Aminosäuren

a) Poly-L-Glutaminsäure

Bereits 1962 konnten G. HOLZWARTH und Mitarbeiter zeigen, daß sich die CD-Spektren der α-Helix-Form und der Random coil-Form von Polyglutaminsäure im fernen UV (245 nm - 185 nm) sehr stark unterscheiden. Allerdings waren ihre Angaben noch so ungenau, daß sie im Bereich um 215 nm für die α-Helix nur einen einzigen negativen Cotton-effekt vermuteten und auch für die Random coil-Form nur einen einzigen Cottoneffekt (bei ca. 200 nm) fanden. 1965 konnten dann G. HOLZWARTH und P. DOTY [19] durch einige technische Verbesserungen das typische Doppelminimum für die α-Helix und auch einen zusätzlichen schwachen positiven Peak zwischen 210 und 235 nm für die Random Form finden. Die Genauigkeit dieser Angaben ist aber noch so gering, daß eine Messung mit den heute zur Verfügung stehenden Apparaten nötig erscheint.

Das Natriumsalz der Poly-L-Glutaminsäure (Mann Research Lab. New York) wurde in 0,1 n NaF - Lsg. gelöst und 24 Stunden gegen mehrere Portionen der gleichen NaF-Lösung dialysiert. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Mikrostickstoffbestimmung in einer Variation der Methode von C. H. LANG [20] und durch Trockengewichtsbestimmung nach ausgiebiger Dialyse gegen bidestilliertes Wasser, Gefriertrocknung und mehrtägiges Trocknen über P_2O_5 bei 30°C im Hochvakuum bestimmt. Nach der Umrechnung auf das Trockengewicht der freien Säure stimmen die aus den verschiedenen Methoden erhaltenen Werte ausgezeichnet überein. (Näheres siehe Experimenteller Teil).

Der p_H-Wert dieser Lösungen lag in allen Fällen bei 7, 9 - 8, 0 und das CD-Spektrum davon wurde ohne weitere Zugabe von NaOH direkt gemessen (bei 25°C). Durch Zugabe von 0, 02 ml 1 n HCl wurde der p_H eines Teils der Lösung auf 4, 0 eingestellt und das CD-Spektrum gemessen.

In Abbildung 2 sind die so erhaltenen CD-Spektren von wässrigen Poly-L-Glutaminsäurelösungen wiedergegeben. Sie wurden als Standardwerte für 100%-ige α-Helix und 100%-ige Random coil-Form gewählt.

Kurve I ergibt für die α-Helix zwei negative Cottoneffekte bei 222, 5 nm und 208 nm und einen starken positiven Cottoneffekt bei 192 nm. Die Cottoneffekte bei 192 nm und 208 nm werden dem $\pi - \pi^*$ Übergang zugeordnet, der nach der Exciton-Theorie in eine senkrecht und parallel zur Helixachse polarisierte Bande aufgespalten ist. Bei der ersten Bande sind das elektrische und das magnetische Übergangsmoment des Gesamtmoleküls gleich, bei der zweiten entgegengesetzt gerichtet. Das führt, da in die Rotatorstärke einer Bande

$$R = \mu_e \cdot \mu_m \cdot \cos \gamma$$

der Kosinus des Winkels zwischen diesen beiden Momenten eingeht [21, 22], zu einem positiven und zu einem negativen Cottoneffekt. Der negative Cottoneffekt bei 222, 5 nm wird dem $n_1 - \pi^*$ - Übergang zugeordnet. +)

Kurve II zeigt das CD-Spektrum der Random coil-Form von Poly-L-Glutaminsäure. Bei 235 nm ist ein äußerst schwacher - aber deutlich erkennbarer - negativer Cottoneffekt vorhanden, an den sich ein ebenfalls schwacher, positiver Cottoneffekt anschließt. Das eigentliche Charakteristikum für diese Form ist jedoch ein starker negativer Cottoneffekt bei 197 nm.

+) Die Benennung der Übergänge entspricht der Nomenklatur von D. L. PETERSON und W. T. SIMPSON [23], die auch die Richtung des elektrischen Übergangsmomentes der N-C=O-Gruppe bestimmt haben.

Über die Theorie der optischen Aktivität der Random coil-Form ist noch sehr wenig bekannt. Doch wird angenommen, daß das CD-Spektrum dieser Form eine Summation der Elliptizitäten der Aminosäurereste darstellt. Diese These wird dadurch bekräftigt, daß C. TANFORD und Mitarbeiter [24] für eine Reihe von Proteinen in 6 molarer Guanidinhydrochloridlösung voneinander abweichende spezifische Drehwerte $\alpha_{300\,nm}$ erhielten. Daß Polysarkosin im gesamten p_H-Bereich von 0 - 12 keinen Circulardichroismus zeigt, wie im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen wurde, kann als weitere Stütze dieser Theorie angesehen werden.

Die verschiedenen Cottoneffekte im fernen UV der Konformationen von Poly-L-Glutaminsäure sind zusammen mit denen von Poly-L-Lysin in Tabelle I zusammengestellt.

b) Poly-L-Lysin

Bei Poly-L-Lysin tritt analog zur Poly-L-Glutaminsäure ein sog. Helix-coil-Phasenübergang bei der Ionisation der Seitenketten auf. So zeigen wässrige Poly-L-Lysinlösungen bei p_H 6,5 - 6,9 das typische CD-Spektrum eines Random coil-Polypeptids, während sich im alkalischen Bereich (p_H : 11,75) die charakteristische Kurvenform der α-Helix ausbildet [25, 26]. Besonders interessant ist es jedoch, daß Poly-L-Lysin in alkalischer Lösung beim vorsichtigen Erhitzen auf 50°C die antiparallele Faltblattstruktur (β-Struktur) einnimmt. Poly-L-Lysin wurde aus diesem Grunde vor allem von N. GREENFIELD, B. DAVIDSON und G. D. FASMAN [27] mit Hilfe der Optischen Rotationsdispersion untersucht und als Standardsubstanz für theoretisch berechnete ORD-Spektren von Mischungen aus verschiedenen Anteilen von α-Helix , Random coil und β-Struktur verwendet.

Poly-L-Lysinhydrochlorid (Mann Research Lab.) wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und 24 Stunden gegen mehrere Portionen bidestilliertes Wasser dialysiert. Die Konzentration dieser Lösung wurde anschließend durch Mikrostickstoffbestimmung und Trockengewichtsbestimmung, wie bei der Poly-L-Glutaminsäure beschrieben, ermittelt. In allen Fällen wurde dabei eine Konzentration von 0,2 - 0,3 mg/ml eingehalten, da höhere Konzentrationen bei der Erhitzung auf 50°C zu größeren Mizellen aggregieren und damit zur Trübung der Lösung führten.

Von einem Teil dieser so erhaltenen Lösung wurde direkt das CD-Spektrum gemessen. Dabei ergab sich der Circulardichroismus der Random coil-Form von Poly-L-Lysin (Abbildung 3 I). Die Übereinstimmung mit der Random coil-Form von Poly-L-Glutaminsäure ist gut.

Ein weiterer Teil der Lösung wurde durch Zugabe von 0,02 ml 1n NaOH auf einen p_H-Wert von 11,75 eingestellt. Das CD-Spektrum dieser Lösung zeigt die typische Kurvenform für α-Helix-förmige Polypeptide (siehe Abbildung 3 II).

Nach der Messung bei 25°C wurde der Küvettenraum des CD-Geräts auf 51,5°C thermostatisiert. Die Änderungen des Circulardichroismus wurden zunächst durch laufende Aufnahme der CD-Spektren verfolgt. Nach ca. 15 Minuten, als nur noch geringfügige Änderungen zu erkennen waren, wurde die Elliptizität bei 117,5 nm so lange in Abhängigkeit von der Zeit gemessen, bis keine Veränderungen mehr auftraten (nach ca. 60 min). Diese so behandelten Proben ergaben das in Abbildung 3 III wiedergegebene CD-Spektrum der β-Form von Poly-L-Lysin, das als Standardwert für 100%-ige β-Struktur verwendet wurde.

Tabelle I: Circulardichroismus von Poly-L-Glutaminsäure und Poly-L-Lysin

λ_{max}	[θ]	Nulldurchgang
A. α-Helix		
I Polyglutaminsäure		
222,5 nm	- 38 750	202 nm
208 nm	- 32 200	
192 nm	+ 83 700	
II Polylysin		
222 nm	- 37 500	200,5 nm
207,5 nm	- 36 550	
192 nm	+ 82 700	
B. Random coil		
I Polyglutaminsäure		
237,5 nm	- 354	230 nm
207,5 nm	+ 3 450	210,5 nm
197 nm	- 32 500	
II Polylysin		
235 nm	- 287	230 nm
217,5 nm	+ 2 680	210,5 nm
197 nm	- 32 000	
C. β - Struktur		
217,5 nm	- 19 350	205,5 nm
195 nm	+ 27 000	

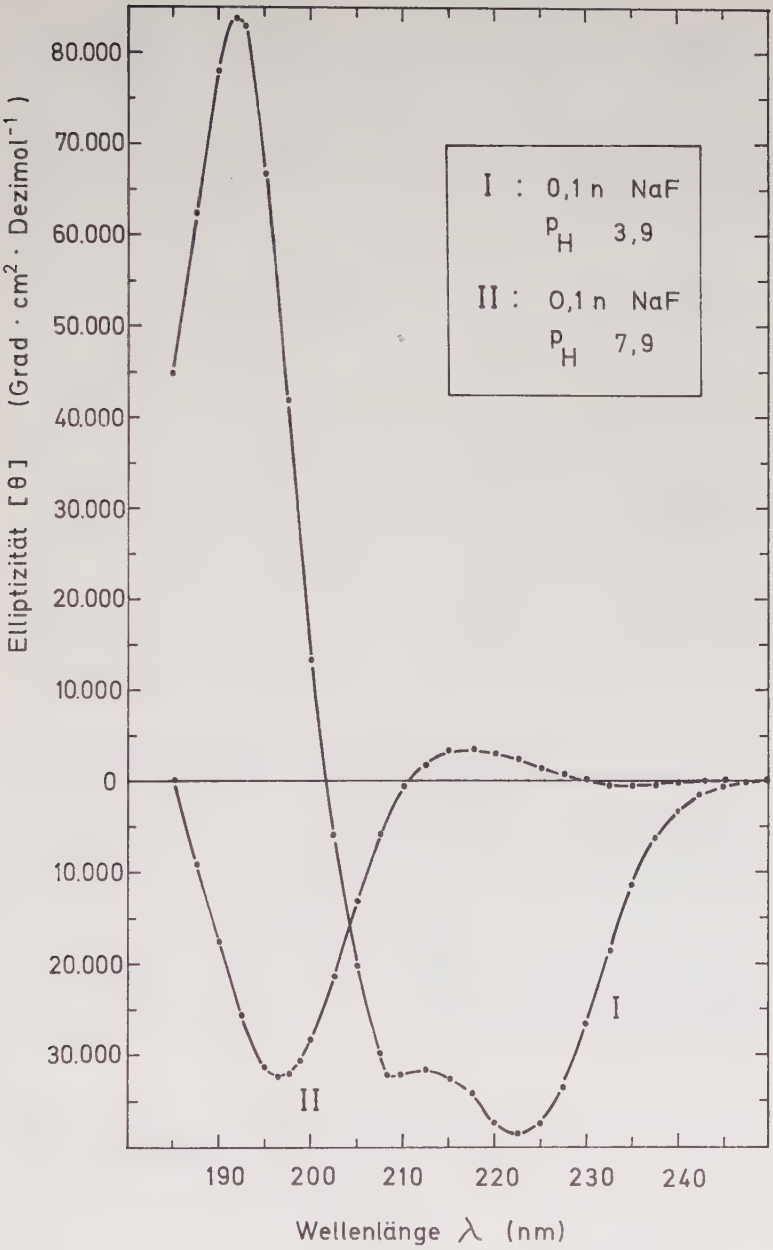


Abb. 2: CD-Spektren von Poly-L-Glutaminsäure

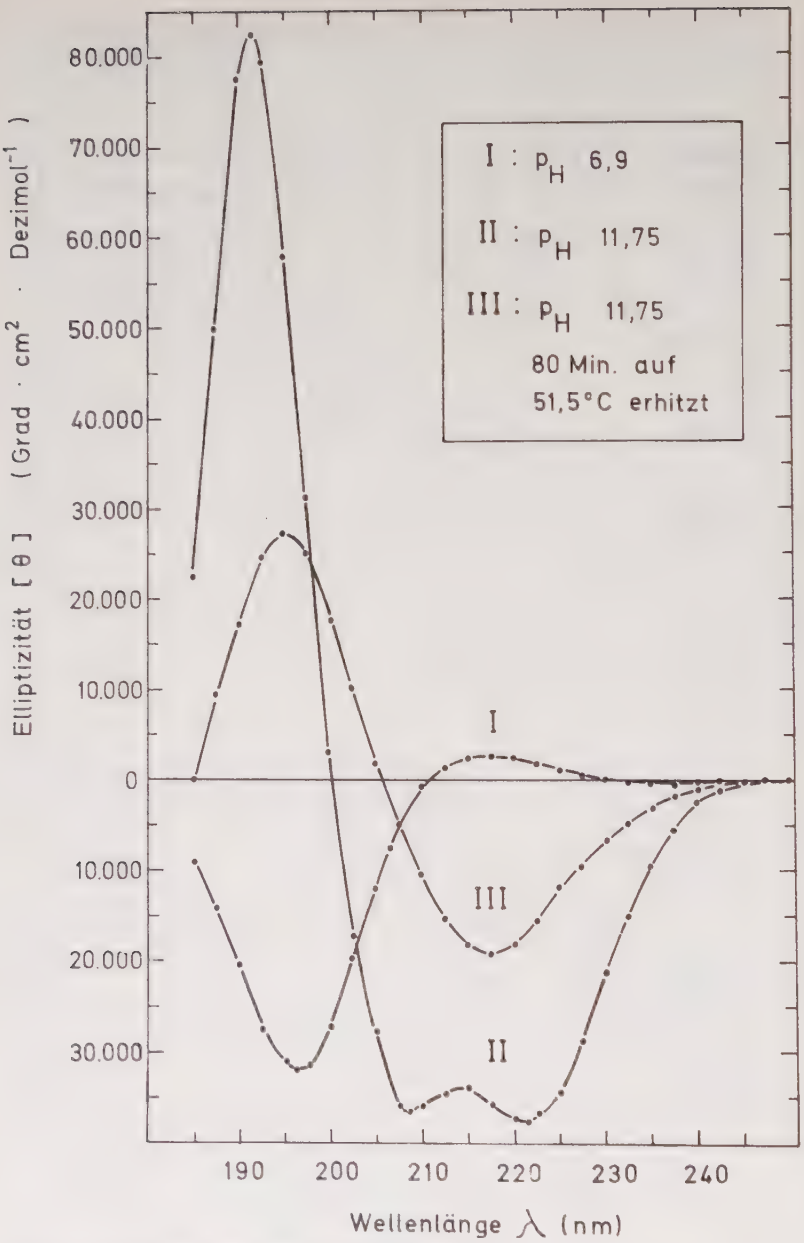


Abb. 3: CD-Spektren von Poly-L-Lysin

c) Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen prozentualen Anteilen an α-Helix, β-Struktur und Random coil

Zur Berechnung der theoretischen Kombinationen aus α-Helix, β-Struktur und Random coil wurden zunächst die jeweiligen prozentualen Anteile in Schritten von 2,5 nm aus den entsprechenden Standardspektren ermittelt, und diese nach der Gleichung

$$[\theta]_{\text{theor.}} = (\theta_{\alpha\text{-Helix}} \cdot a + \theta_{\text{Random}} \cdot b) \cdot + \theta_{\beta\text{-Str.}} \cdot c$$

so kombiniert, daß die Summe aus den Einzelanteilen stets 100 ergab.

Es wurde so eine Reihe von Kurvenscharen mit jeweils steigendem fixen Anteil an β-Struktur erhalten (Abbildungen 4 - 7). Außerdem wurden noch die Kombinationen aus α-Helix und β-Struktur bei 0% Random coil, und aus β-Struktur und Random coil bei 0% α-Helix berechnet (Abbildungen 8 und 9). Diese Kombinationen könnten unter Umständen für die Ermittlung der Sekundärstruktur von fibrinogenen und nicht helixhaltigen Proteinen von Bedeutung sein.

In Abbildung 4 sind die Kombinationen von α-Helix und Random coil bei 0% β-Struktur wiedergegeben. Als charakteristisches Merkmal ist dabei das Verhältnis der beiden negativen Cottoneffekte zueinander zu betrachten. Bei 100%-iger α-Helix ist der Cottoneffekt bei 222,5 nm intensitätsstärker als der bei 208 nm. Bei steigender Random coil wird jedoch dieser - relativ gesehen - stärker und ist bei 60 % Random bereits merklich deutlicher ausgeprägt als der bei 222,5 nm. Diese Erscheinung wurde auch häufig bei der Denaturierung von Apomyoglobin beobachtet.

Außerdem nimmt die Intensität des positiven Cottoneffekts, neben einer Blauverschiebung des Maximums, relativ zu den negativen sehr stark

ab, um schließlich bei sehr hohen Gehalten an Random coil ganz zu verschwinden. Als drittes Merkmal für eine Änderung des α-Helix : Random coil-Verhältnisses ist die Blauverschiebung des Nulldurchganges (im Gegensatz zur Rotverschiebung bei steigenden Mengen an β-Struktur) anzusehen.

Bemerkenswert erscheint auch, daß die Bande bei 222,5 nm selbst bei sehr geringen α-Helixgehalten erhalten bleibt, und so auch diese geringen Helixanteile noch anzeigt. Außerdem tritt dabei auch eine geringe Rotverschiebung dieses Cottoneffektes auf.

Abbildung 5, 6 und 7 zeigen die Kombinationen von verschiedenen Anteilen Helix / Random bei fixen aber jeweils steigenden Anteilen an β-Struktur. Während bei 20 % β-Struktur das typische Kurvenbild der α-Helix noch gut zu erkennen ist, und auch in diesem Fall der negative Cottoneffekt bei kurzen Wellenlängen mit steigenden Anteilen Random coil intensiver wird, ist das Doppelminimum bei 40 % β-Struktur nur noch schwach angedeutet. Bei 60 % β-Struktur ist nur noch ein breiter, negativer Cottoneffekt - entsprechend dem Standardspektrum der β-Struktur - zu erkennen.

Zur Untersuchung von Proteinen mit hohem Anteil an β-Struktur und der Vollständigkeit halber wurden auch noch die Kombinationen α-Helix / β-Struktur (bei 0% Random) und Random / β-Struktur (bei 0% α-Helix) berechnet, obwohl das für die Bestimmung der Sekundärstruktur aus den CD-Spektren sowohl des Myoglobins und Apomyoglobins als auch der Ferredoxine nicht nötig erscheint. Die so erhaltenen Kurvenscharen sind in Abbildung 8 und 9 wiedergegeben.

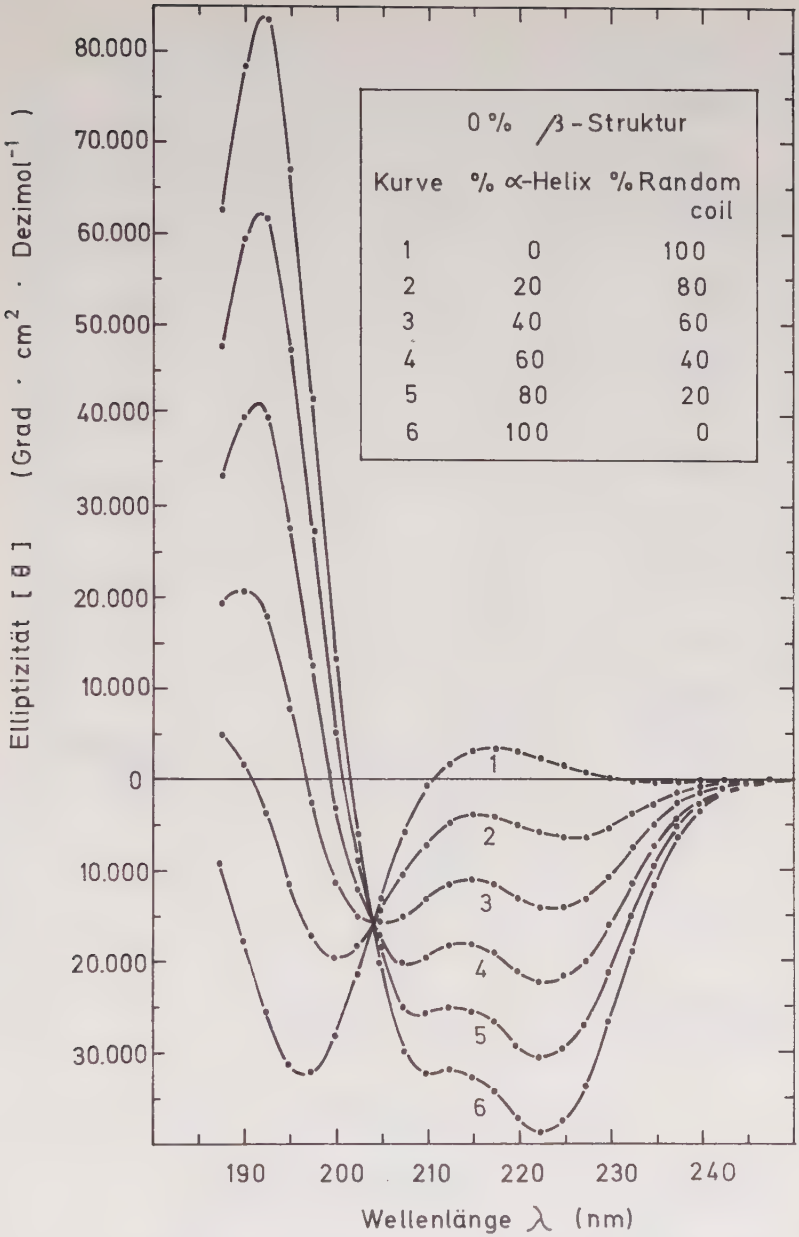


Abb. 4: Berechnete CD-Spektren von verschiedenen Anteilen an α -Helix und Random coil

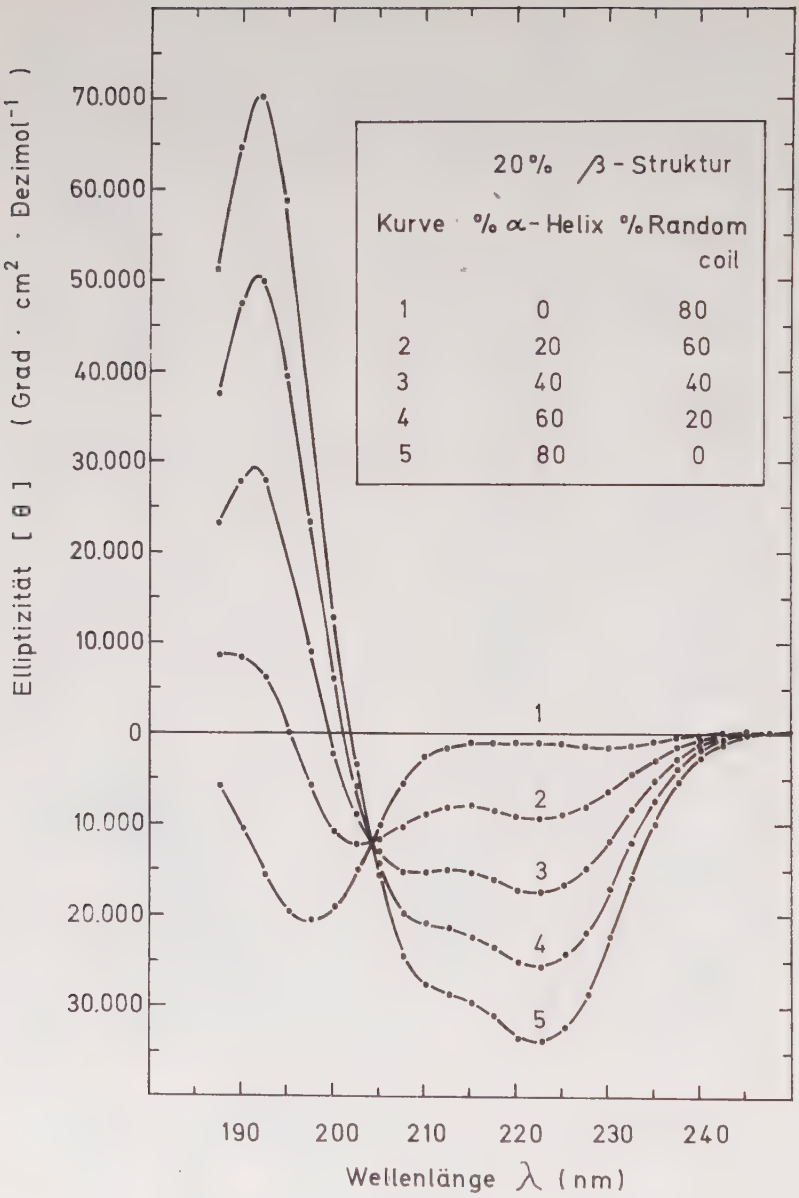


Abb. 5: Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen Anteilen an α -Helix und Random coil bei 20 % β -Struktur

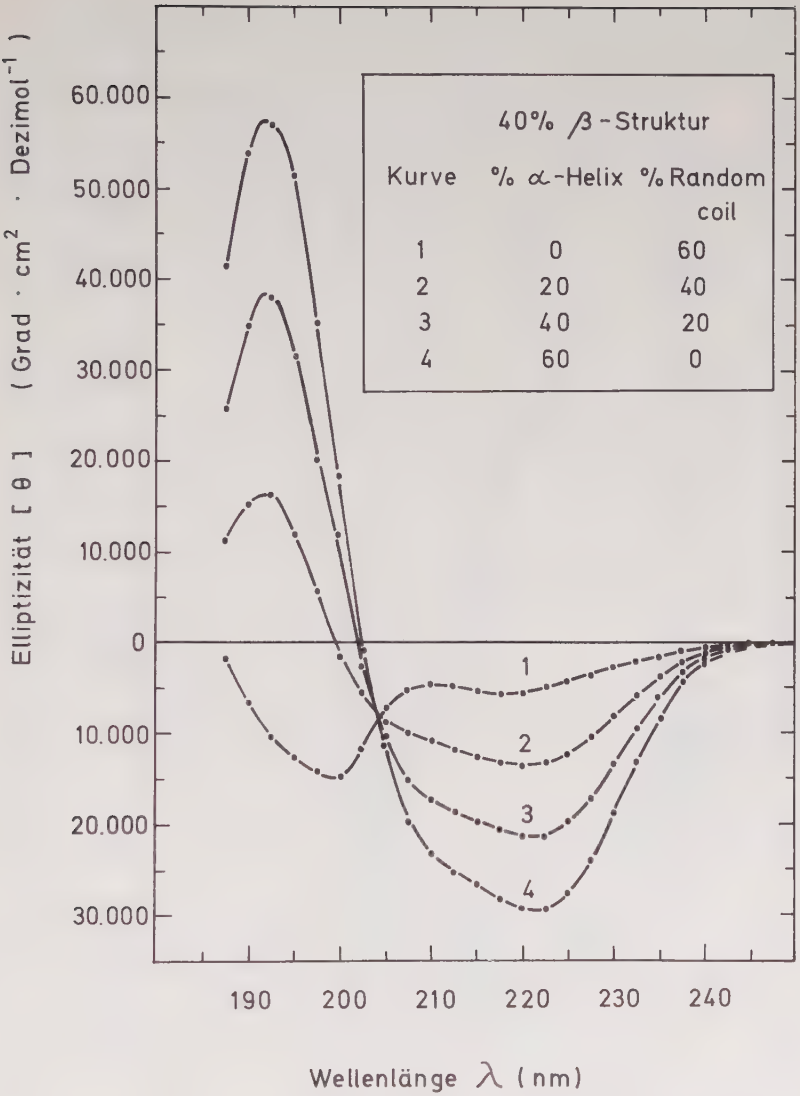


Abb. 6: Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen Anteilen an α-Helix und Random coil bei 40 % β-Struktur

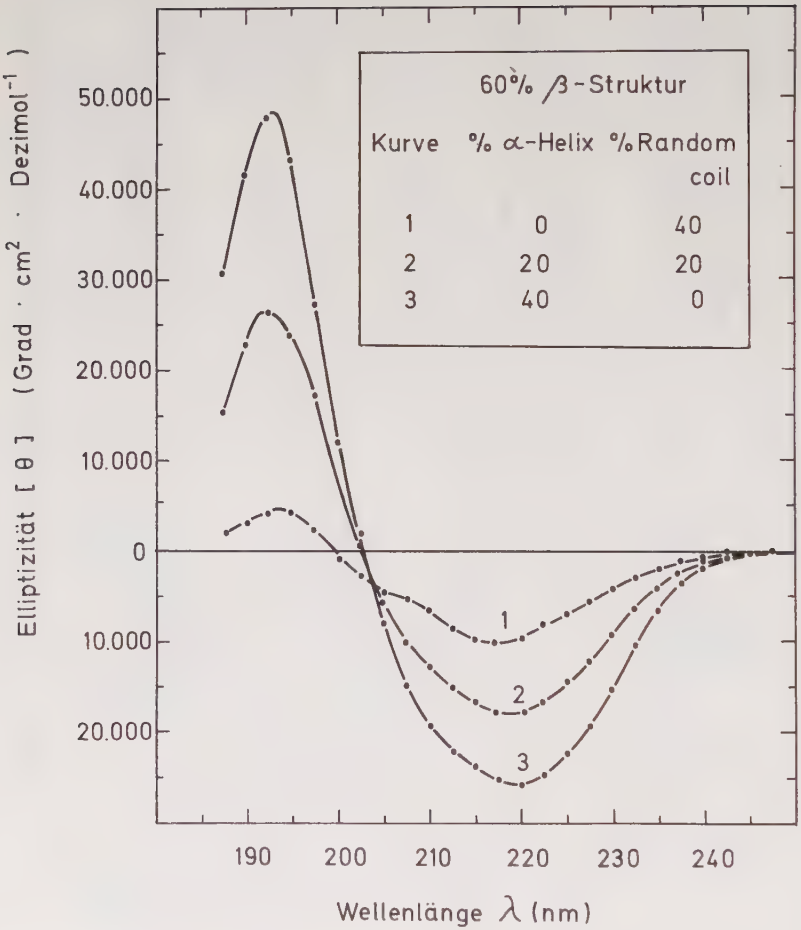


Abb. 7: Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen Anteilen an α-Helix und Random coil bei 60 % β-Struktur

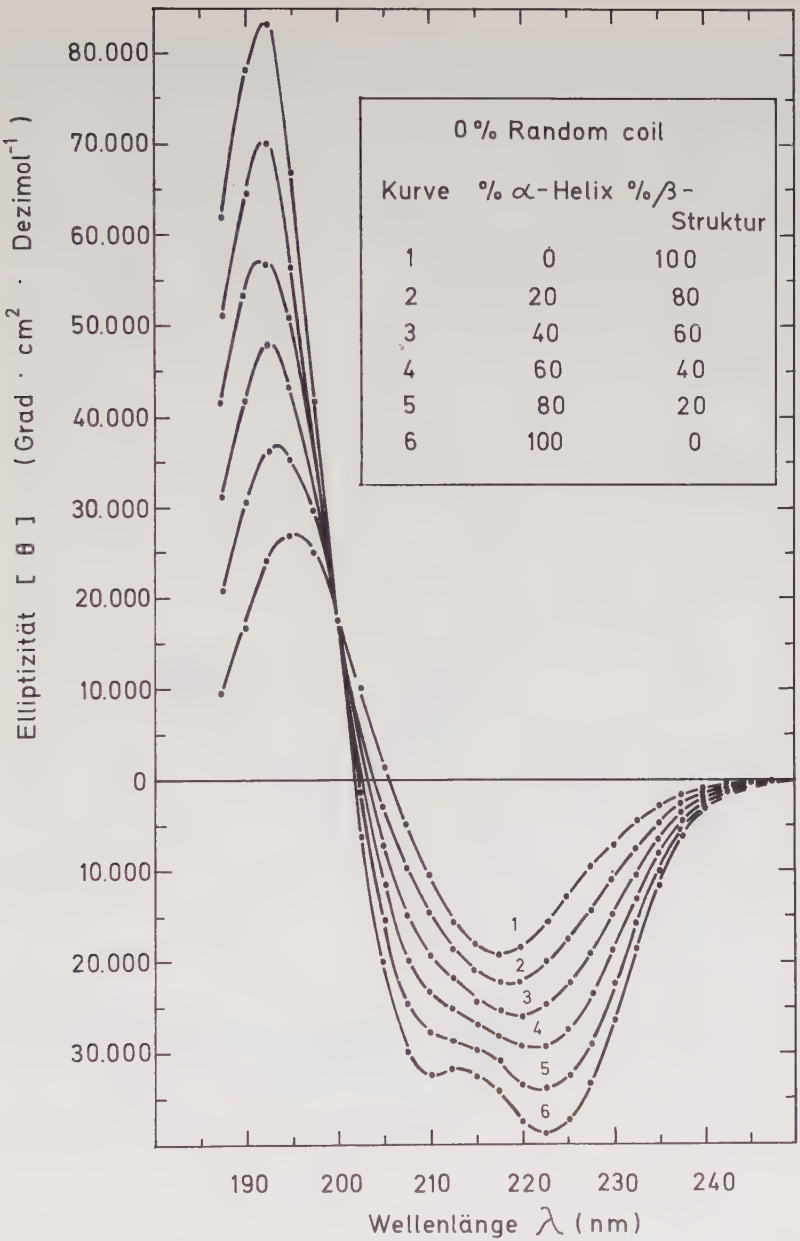


Abb. 8: Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen Anteilen an α-Helix und β-Struktur

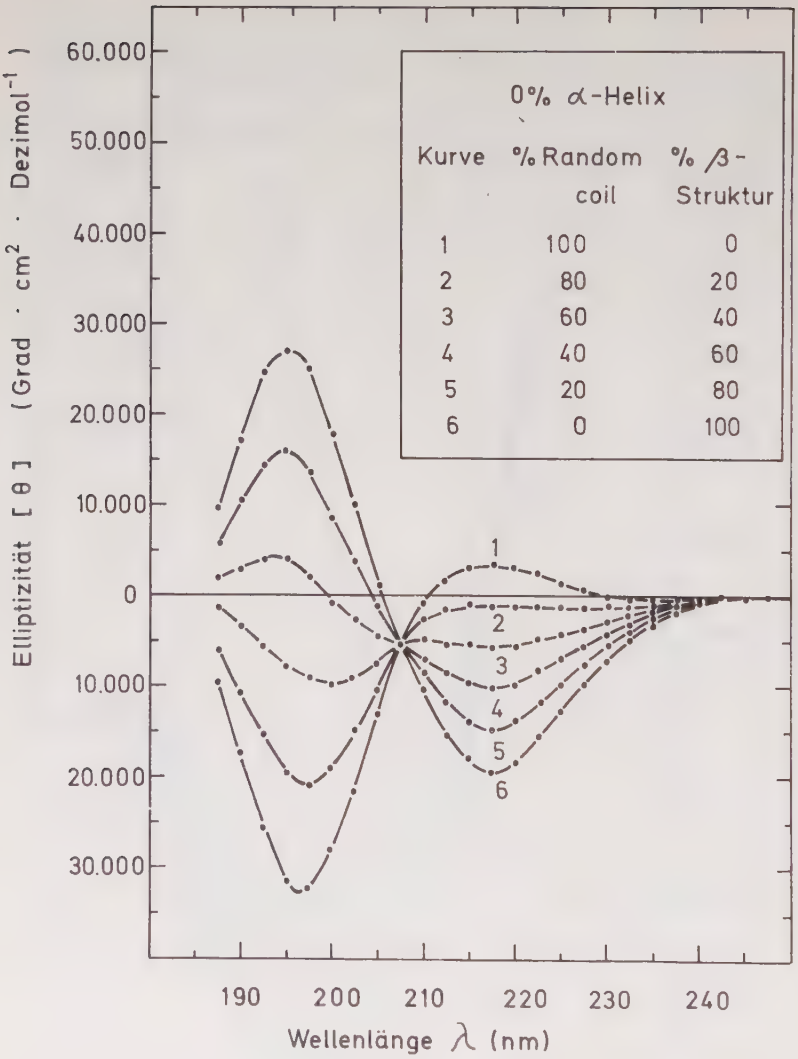


Abb. 9: Berechnete CD-Spektren bei verschiedenen Anteilen an Random coil und β-Struktur

II. CD-Spektren von Pottwalmetmyoglobin und Pottwal-Apomyoglobin

Handelsübliches Pottwalmetmyoglobin wurde von der Pierce Chemical Comp. bezogen. Da der Reinheitsgrad des Handelsprodukts den gestellten Forderungen nicht genügte, wurde es durch Gelfiltration an Sephadex G 75 und Sephadex G 50 gereinigt. Nach zwei Reinigungsschritten lag das Extinktionsverhältnis der Soretbande zum Proteinpeak (E_{408nm}/E_{280nm}) im allgemeinen bei 5,00 - 5,35 . Nur Myoglobin mit diesem Extinktionsverhältnis wurde sowohl für die CD-Messungen als auch für die Abspaltung der Hämgruppe zur Darstellung von Apomyoglobin verwendet. CD-Spektren von Metmyoglobin und Apomyoglobin bei verschiedenen p_H-Werten ergeben eine relativ große Stabilität der Konformation über einen weiten p_H-Bereich (3,0 - 11,0), doch ist die Stabilität bei p_H 7,0 (isoelektrischer Punkt) am größten. Die nachfolgenden CD-Spektren zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Pottwalmetmyoglobin wurden daher in bidest. Wasser durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt das gemessene CD-Spektrum von Metmyoglobin und das durch Kombination von 70 % α-Helix und 30 % Random coil theoretisch berechnete Dichrogramm. Die Übereinstimmung ist im gesamten Spektralbereich außerordentlich gut, im Gegensatz zur CD-Kurve mit nur 70 % α-Helix, die vor allem im Bereich der Banden bei 222 nm und 192 nm sehr starke Abweichungen zeigt. Gerade diese Kurven, mit prozentualen Anteilen der α-Helix als einzigem Standard für die Sekundärstruktur, wurden bisher als Vergleichsspektren verwendet. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in fast allen Fällen die Angaben für die aus CD-Messungen bestimmten Sekundärstrukturen, hinsichtlich der Helixwerte, beträchtlich niedriger sind als sie es auf Grund der röntgenographischen Daten sein sollten.

Die Sekundärstruktur mit 70 % α-Helix und 30 % Random coil für Pottwalmetmyoglobin in wässriger Lösung kann daher als richtiger angesehen werden als die früher durch Vergleich der Banden bei 222 nm mit Polyglutaminsäure als Vergleich bestimmten Werte. Zumal in diesem Fall auch ganz offensichtlich zu niedere Werte sowohl für Myoglobin als auch für den Standard gemessen wurden, und die Spektren nur bis 220 nm verfolgt wurden.

Die Übereinstimmung mit den röntgenographisch bestimmten Daten ist in diesem Fall außerdem besser erfüllt.

Pottwalapomyoglobin wurde aus Metmyoglobin ($E_{408}/E_{280} = 5,31$) durch Abspaltung von Häm durch Behandeln mit verdünnter Salzsäure und anschließender Extraktion mit Methyl-Äthyl-Keton in einer Variation der von F. W. J. TEALE [28] angegebenen Methode dargestellt. Die Reinheit des so erhaltenen Globins wurde spektrometrisch bestimmt. Der Anteil an nicht umgesetztem Metmyoglobin betrug in allen Fällen unter 0,5 %.

Von jeweils frisch hergestelltem Apomyoglobin wurde direkt aus der Stammlösung (ohne Gefriertrocknung) das CD-Spektrum aufgenommen. Die so erhaltenen Ergebnisse sind zusammen mit der am besten passenden Kombination aus α-Helix und Random coil (50 %/ 50 %) in Abbildung 11 angegeben. Entsprechend den Angaben von E. BRESLOW [29] und Mitarbeiter wird durch Abspaltung der Hämgruppe der α-Helixanteil stark verringert. Die Sekundärstruktur für das Pottwalapomyoglobin enthält danach 50 % α-Helix und 50 % Random coil - Struktur. Übereinstimmend mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse und entgegengesetzt den Ergebnissen von N. GREENFIELD, B. DAVIDSON und G. D. FASMAN [27] können sowohl im Apo- als auch im Metmyoglobin keine Anteile an β-Struktur an der Konformation festgestellt werden.

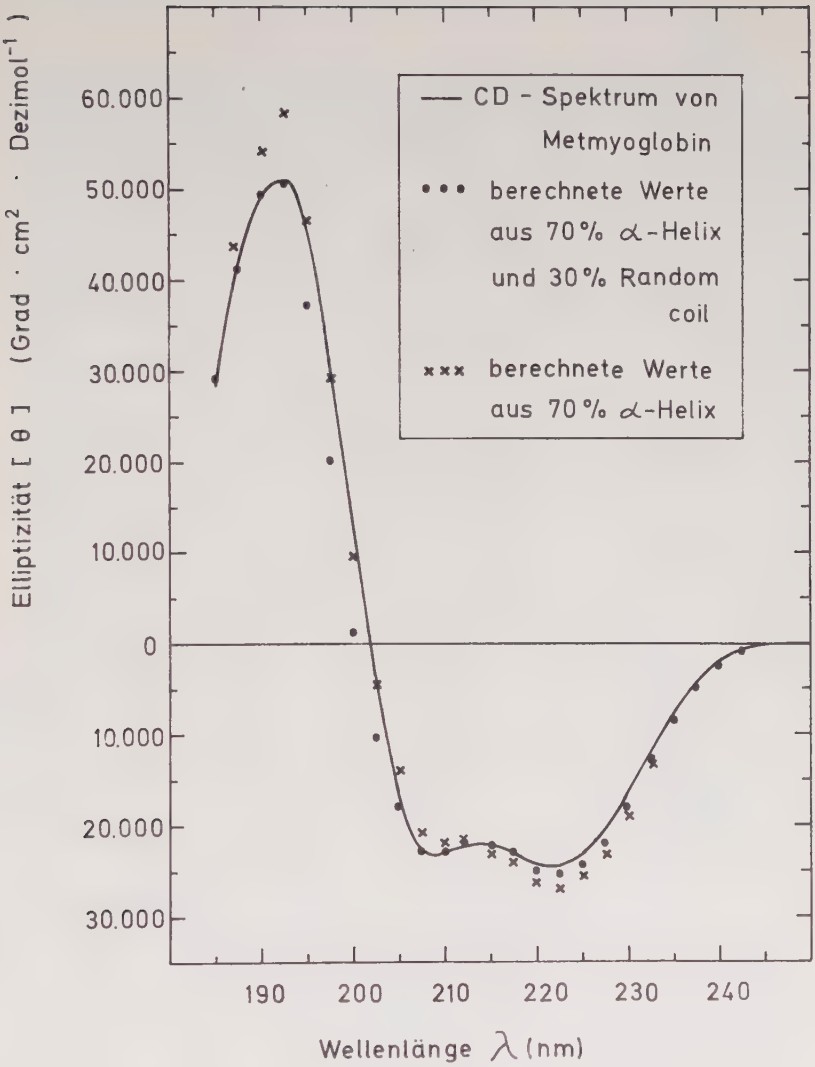


Abb. 10: CD-Spektrum von Metmyoglobin aus Pottwal

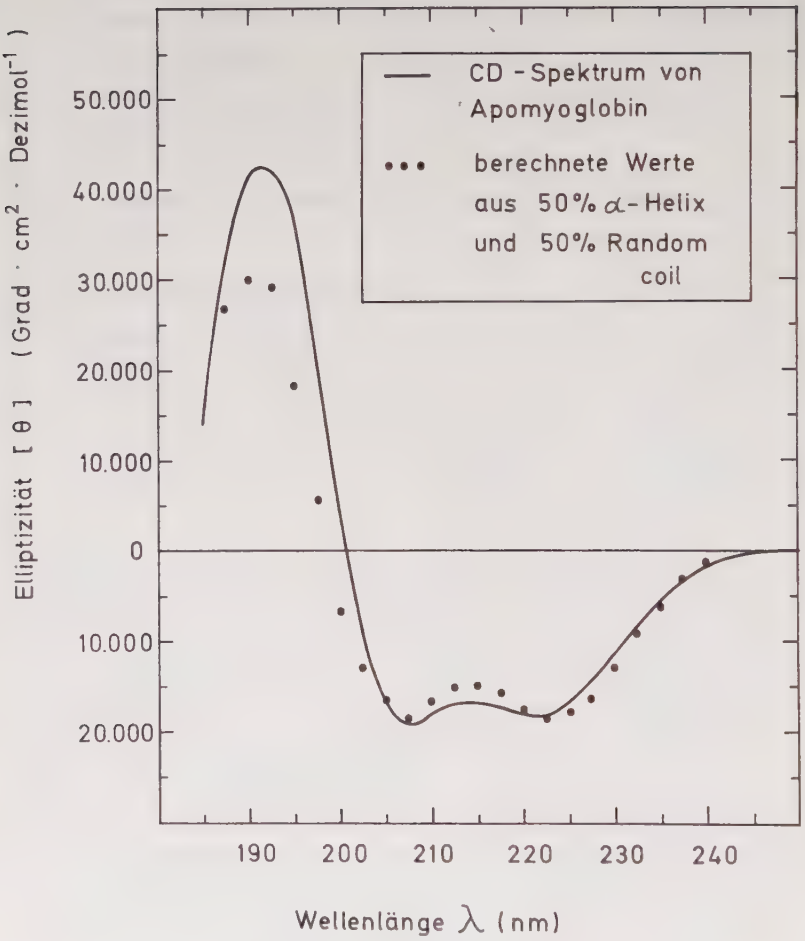


Abb. 11: CD-Spektrum von Apomyoglobin aus Pottwal

III. CD-Spektren von Ferredoxinen und Apo-Ferredoxinen

Der Circulardichroismus von Ferredoxin und anderen Nicht-Häm-Eisen-Proteiden im Sichtbaren und im nahen UV ist in einer Reihe von Arbeiten bereits genau untersucht worden [30 - 33]. Vergleichende Betrachtungen über Ähnlichkeiten in den Aktivzentren der Proteide standen dabei im Vordergrund, doch ist über den Circulardichroismus im fernen UV, der Einblick in die Sekundärstruktur des Proteins ergibt, bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Auch mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse ist es nicht gelungen, die Struktur dieser Proteide aufzuklären. Die Schwierigkeiten liegen vor allem daran, daß neben der Sekundärstruktur noch starke Einflüsse der durch S-S-Brücken fixierten Tertiärstruktur hinzukommen. S-S-Brücken können außerdem noch Cottoneffekte im fernen UV hervorrufen, die eine bestimmte Konformation vortäuschen oder die Interpretation der Sekundärstruktur erschweren können. Als weiteres erschwerendes Moment kommt noch hinzu, daß bei den nativen Proteiden Cottoneffekte bis unter 300 nm auftreten, die den Charge-Transfer-Banden des Eisen- und Schwefelhaltigen Aktivzentrums zugeschrieben werden. Es ist daher nicht möglich, die Cottoneffekte zwischen 250 nm und 200 nm auf Grund der großen Bandbreite der Effekte bei der Optischen Rotationsdispersion mit dieser Methode aufzulösen. Diese Schwierigkeit scheint beim Circulardichroismus auf Grund der sehr geringeren Halbwertsbreite der Banden keine so große Rolle zu spielen.

Da bei den Ferredoxinen somit noch zusätzliche mögliche Cottoneffekte zu beachten sind, ist es verständlich, daß die Übereinstimmung der gemessenen mit den berechneten Spektren nicht so gut wie beim Myoglobin ist. Die Übereinstimmung ist jedoch auch hier im gesamten Kurvenbereich noch außerordentlich befriedigend und liegt im allgemeinen noch innerhalb des Fehlerbereichs der gemessenen Kurve,

der auf Grund der Konzentrationsbestimmung der Proteine anzunehmen ist.

a) Ferredoxin und Apoferredoxin aus Clostridium pasteurianum

In Abbildung 12 sind die CD-Spektren von Clostridienferredoxin und von durch Abspalten des Aktivzentrums mit α, α'-Dipyridyl erhaltenem Apoferredoxins angegeben. Im Gegensatz zu den Kurvenbildern der stark helixhaltigen Myoglobine ergibt sich sowohl beim Ferredoxin als auch beim Apoferredoxin ein CD-Spektrum, das von sehr großen Anteilen der Random coil-Form bestimmt wird. Bei der Berechnung der am besten passenden Kombination aus α-Helix, Random coil und β-Struktur ergibt sich, daß auch bestimmte Anteile der β-Struktur vorhanden sein müssen, um das gemessene CD-Spektrum zu beschreiben. Am besten ist hierfür die Kombination aus 70 % Random coil, 20 % β-Struktur und 10 % α-Helix geeignet. Allerdings kann man bei geringen Anteilen an α-Helix diese nicht mehr eindeutig von der β-Form unterscheiden, so daß es nicht sicher ist, ob überhaupt Anteile der α-Helix enthalten sind.

b) Ferredoxin und Apoferredoxin aus Spinat

Während beim Clostridienferredoxin das native und das Apoprotein fast identische CD-Spektren mit einem sehr geringen α-Helixanteil aufweisen, ergeben sich beim Spinatferredoxin für das native Ferredoxin und für das Apoprotein zwei verschiedene CD-Spektren.

Das Apoferredoxin ergibt ein sehr ähnliches CD-Spektrum wie das der Clostridienferredoxine mit sehr wenig α-Helixanteilen, das native Spinatferredoxin dagegen ein CD-Spektrum, dessen Kurvenform auf

einen erheblich höheren α-Helixanteil hinweist. Durch Vergleich mit den entsprechenden Modellkurven ergibt sich für das native Spinatferredoxin eine Sekundärstruktur mit 50 % Random coil, 20 % β-Struktur und 30 % α-Helix.

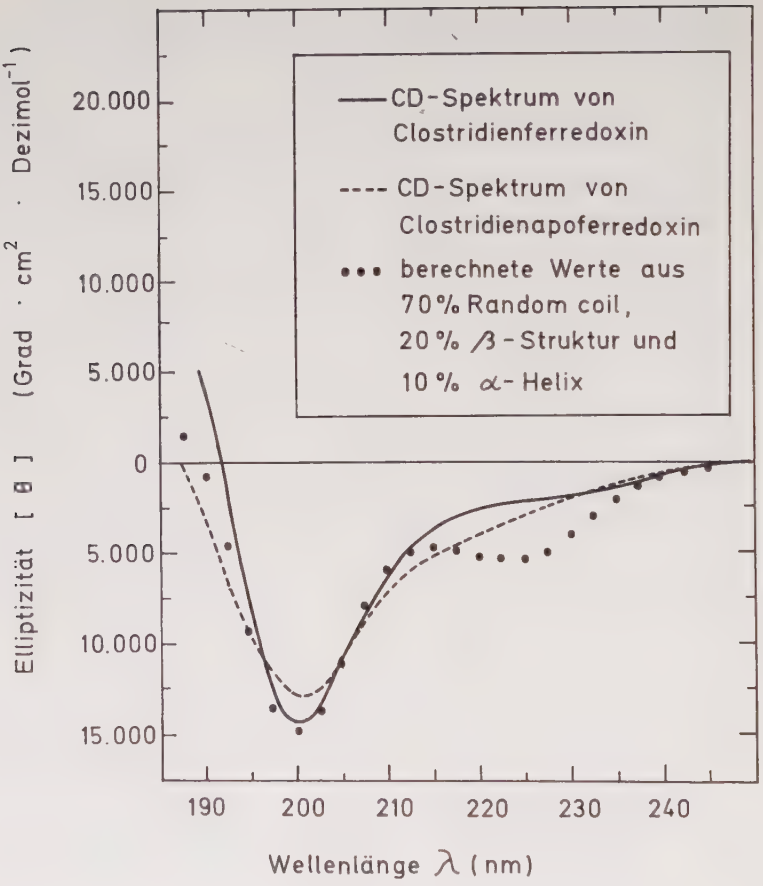


Abb. 12: CD-Spektren von Clostridienferredoxin und Clostridienapoferredoxin

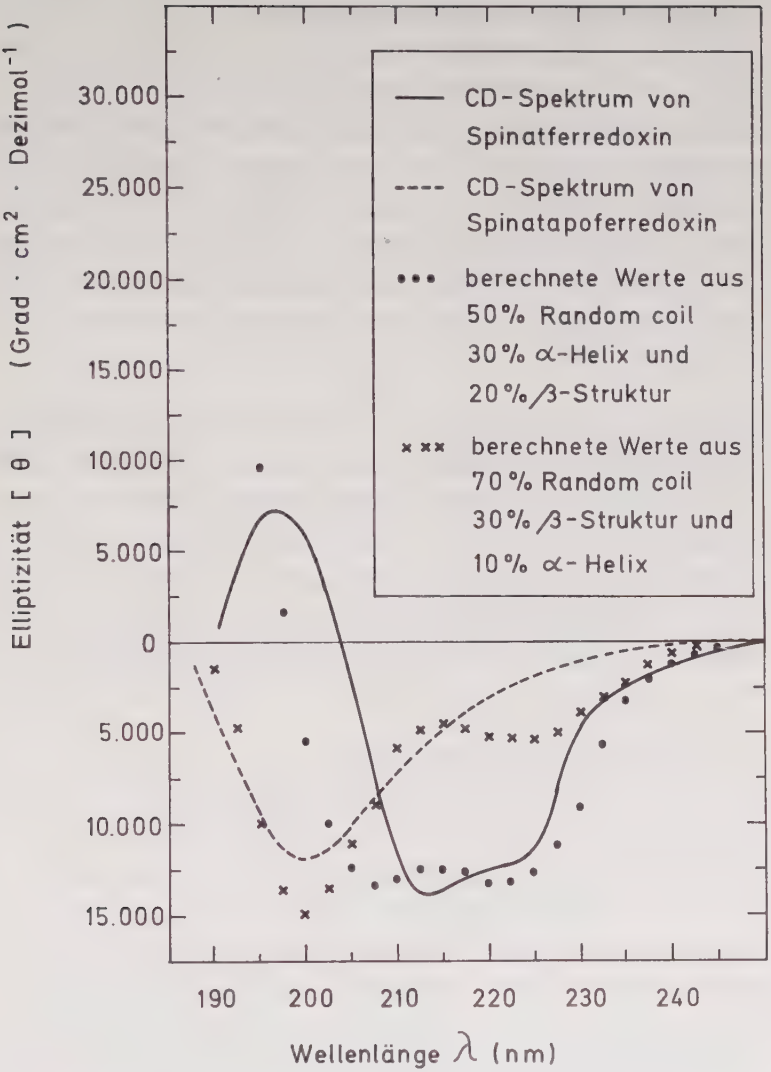


Abb. 13: CD-Spektren von Spinatferredoxin und Spinatapoferredoxin

IV. ^{19}F - NMR - Untersuchungen der Strukturen höherer Ordnung von Proteinen und Poly-α-L-Aminosäuren

In neuerer Zeit wurde verschiedentlich versucht, mit Hilfe der hochauflösenden Protonenresonanzspektroskopie (220 MHz), durch Messung der chemischen Verschiebung der α-CH-Protonen, gewisse Aussagen über die Sekundärstruktur von Proteinen zu machen [34 - 36]. Unzählige Spin-Spin-Wechselwirkungen ergeben jedoch vor allem bei größeren Molekülen derart breite Banden, daß die einzelnen Signale nicht mehr aufgelöst werden und eine Interpretation dadurch sehr erschwert oder sogar unmöglich gemacht wird.

Dagegen ergeben sich bei der ^{19}F-NMR-Spektroskopie unkomplizierte und auch leichter interpretierbare Spektren mit einfachen Singuletts [37]. Da die chemischen Verschiebungen des Fluors sich außerdem über einen mehr als zehnmal größeren Bereich erstrecken als das bei Protonenverschiebungen der Fall ist, können mit der ^{19}Fluorresonanz auch noch Verbindungen sehr ähnlicher Struktur unterschieden werden. Es bietet sich daher an, diese Untersuchungsmethode auch für die Ermittlung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu verwenden [38].

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Leistungsfähigkeit der ^{19}F-NMR-Spektroskopie durch Vergleich mit den bekannten, aus Circulardichroismusmessungen erhaltenen Ergebnisse geprüft werden. Poly-L-Lysin (Mann Research Lab. MG 150 000) wurde zu diesem Zweck mit Trifluoressigsäuremethylester bei p_H 8,0 (Triäthylamin) trifluoracetyliert [39]. Niedermolekulare Verunreinigungen und Nebenprodukte wurden vom Makromolekül entweder durch Gel-Filtration an Sephadex LH 20 (Laufmittel Äthanol) oder durch Dialyse gegen mehrere Portionen frisch destilliertes Äthanol abgetrennt.

Die so erhaltene Lösung von trifluoracetyliertem Poly-L-Lysin in Äthanol ergibt im ^{19}F-NMR-Spektrum ein Singulett relativ geringer Halbwertsbreite (ca. doppelte Halbwertsbreite von Trifluoressigsäuremethylester). Schon geringe strukturelle Änderungen wirken sich jedoch stark auf die chemische Verschiebung aus. Ein derart scharfes Signal - wie das erhaltene - kann somit nur von Fluoratomen herrühren, die sich in nahezu äquivalenter Umgebung befinden. Bei einer ungeordneten Struktur wäre das aber unmöglich. Man kann daher der Messung des ^{19}F - Signals entnehmen, daß sich trifluoracetyliertes Poly-L-Lysin in Äthanol in einer Anordnung von sehr hohem Ordnungsgrad befinden muß.

Die Aufnahme des Circulardichroismus ergibt, daß trifluoracetyliertes Poly-L-Lysin in Äthanol eine außerordentlich stabile α-Helix ausbildet, die selbst durch Zugabe großer Mengen Harnstoff und Guanidinhydrochlorid nicht zerstört werden kann. Das Singulett des trifluoracetylierten Poly-L-Lysins, das durch Interpretation des ^{19}F-NMR-Spektrums allein einer sehr geordneten Struktur zugeschrieben wird, kann somit sehr wahrscheinlich der α-Helix-Form zugeordnet werden.

Herrn Dipl. Chem. Paul Hunziker möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Trifluoracetylierung von Poly-L-Lysin, sowie die Aufnahme und Interpretation der ^{19}F-NMR-Spektren danken.

V. Konformation, Stabilität, Denaturierung und Renaturierung von Pottwal-Apomyoglobin

Die Frage nach der Entstehung der Strukturen höherer Ordnung von Proteinen und damit auch nach der biologisch aktiven Form von Enzymen scheint allein mit Hilfe von chemischen Experimenten am aktiven Protein nicht ganz zu lösen zu sein. Zwar ergeben Untersuchungen der Konformation unter dem Einfluß von verschieden wirkenden, denaturierenden Agentien gewisse Informationen in Bezug auf nicht kovalente Bindungen der Makromoleküle - wie im Laufe dieses Abschnittes noch gezeigt werden wird - doch kann eine endgültige Klärung der Frage, ob die Aminosäuresequenz bereits alle Information hinsichtlich der räumlichen Anordnung des Proteins enthält, nicht erreicht werden.

Die Aussagemöglichkeiten sind vor allem dadurch begrenzt, weil es nicht bekannt ist, ob unter dem Einfluß von Denaturierungsmitteln nicht doch noch lokale Zentren mit bestimmten Informationsgehalten, gewissermaßen als Kristallisationskeime, erhalten bleiben, obwohl die Messung des Circulardichroismus keine geordnete Struktur mehr anzeigt (100 % Random coil).

Die chemische Synthese eines räumlich stark strukturierten Proteins würde diese Frage jedoch endgültig klären. Die Stabilitätsuntersuchungen am Apomyoglobin wurden daher vor allem im Hinblick auf eine chemische Synthese unternommen, nachdem es mit Hilfe der Festkörpersynthese nach R. B. MERRIFIELD [40] möglich erscheint, auch Proteine mit über hundert Aminosäureresten zu synthetisieren [41].

Neben Untersuchungen über die Einwirkung von klassischen Denaturierungsmitteln, wie Guanidinhydrochlorid, Harnstoff und Natrium-

dodecylsulfat auf Apomyoglobin, sollte daher vor allem auch die Stabilität von Apomyoglobin unter den Bedingungen der Festkörperpeptidsynthese erforscht werden. Das Verhalten in Trifluoressigsäure, bromwasserstoffhaltiger Trifluoressigsäure und in verschiedenen organischen Lösungsmitteln war dabei besonders interessant.

Die Konformation und Stabilität von Apomyoglobin wurde auf zwei verschiedene Arten untersucht.

A. Durch die Messung des Circulardichroismus konnten Änderungen der Konformation unter dem Einfluß der verschiedenen Denaturierungsmittel verfolgt werden.

B. Durch Kombination des Globins mit Hämin wurde der jeweilige Anteil am nativen Zustand des Apomyoglobins bestimmt, da Apomyoglobin nur bei richtiger räumlicher Anordnung die Hämgruppe zum intakten Metmyoglobin einbaut.

Dazu wurde in einer Variation, der von E. BRESLOW [29] angegebenen Methode, Häminchlorid (EGA - Chemie KG., Steinheim) in wenig 1 n NaOH gelöst und sofort mit Boratpuffer der Ionenstärke 0,16 p_H 10,3 verdünnt. Steigende Mengen dieser Lösung wurden zu Lösungen des Globins in demselben Puffer gegeben und die Extinktion bei 408 nm (Soretbande) nach zweieinhalbstündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur gemessen. Gleichzeitig wurden auch die der reinen Häminlösungen aufgenommen. Die Extinktionen wurden nun in Abhängigkeit der zugegebenen Menge Häminchlorid aufgetragen. Ein Beispiel ist in Abbildung 14 angegeben. Aus den Knickpunkten läßt sich direkt die Menge des eingebauten Häms ablesen. Die Umrechnung auf molare Mengen ergibt das Verhältnis von "nativem" zum insgesamt eingesetztem Globin.

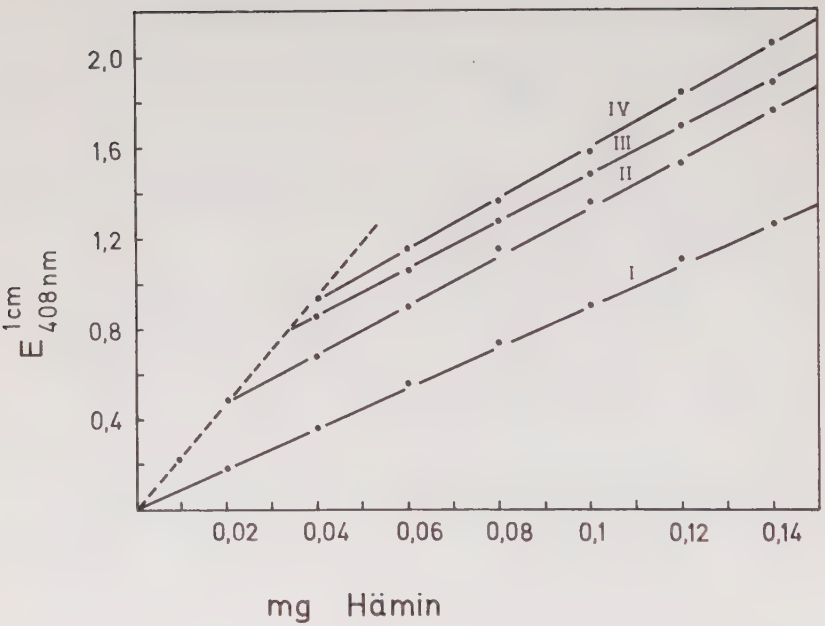
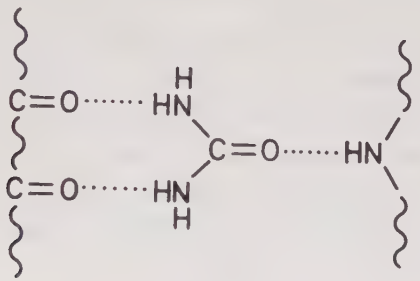


Abb. 14: Rekombination von verschieden behandelten Apomyoglobinen mit Häminchlorid.
I Häminchloridlösung
II Mit Trifluoressigsäure und anschließend mit 6 m Guanidinhydrochlorid behandeltes Globin + Häminchlorid
III Mit Trifluoressigsäure behandeltes Globin + Häminchlorid
IV Unbehandeltes Globin + Häminchlorid

Jeweils in Boratpuffer p_H 10, 3 Ionenstärke: 0, 16.

a) Behandlung von Apomyoglobin mit Harnstoff und Guanidinhydrochlorid

Die Konformation von Proteinen wird von einer Reihe verschiedener nicht kovalenter Bindungen bestimmt. Neben den hydrophoben Anziehungskräften sind dabei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Saurerstoffatom der Carbonyl-Gruppe und dem Wasserstoffatom der Imido-Gruppe besonders wichtig. Moleküle wie Harnstoff und Guanidinhydrochlorid, die ihrerseits sehr leicht intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden können, lösen die intramolekularen Wasserstoffbrücken des Proteins, indem sie sich sowohl an die H-Atome der Amid-Gruppe als auch an die O-Atome der Carbonyl-Gruppe entsprechend der Formel I anlagern.



I

Die Fähigkeit, die H-Brücken des Makromoleküls zu lösen, nimmt vom Harnstoff zum Guanidinhydrochlorid zu [42]. Die Denaturierung von Apomyoglobin wurde aus diesem Grund anfänglich in 8 molarem Harnstoff, später jedoch in 6 - 7 molarem Guanidinhydrochlorid, untersucht.

Vollaktives Apomyoglobin (CD-Spektrum und Rekombination mit Häm) wurde in 3 molarem Guanidinhydrochlorid gelöst, und das CD-Spektrum davon aufgenommen. Dieses zeigt noch einen geringen Anteil an α-Helix an (Abbildung 13). Da daher noch geringe Reste des nativen Zustan-

des erhalten geblieben sein mußten, wurde die Lösung durch weitere Zugabe von Guanidinhydrochlorid 6 molar (bzw. in einigen Fällen 7 molar) gemacht, und davon das CD-Spektrum nach 48 stündigem Stehenlassen aufgenommen. In diesem Fall können keine Überreste von α-Helixsträngen mehr erkannt werden. Das Molekül erscheint also - hinsichtlich der Wasserstoffbrücken - völlig denaturiert zu sein.

Von besonderem Interesse war es nun, ob die Konformation des nativen Globins nach Entfernen des Guanidinhydrochlorids wieder erhalten wird, da auf diese Weise auch eventuell entstandene Fehlkonformationen bei der Synthese in vitro, durch völliges Auflösen aller Wasserstoffbrücken mit Guanidinhydrochlorid und anschließende Entfernung dieses Agens, in den "nativen" Zustand übergeführt werden könnten.

Die 6 molare, proteinhaltige Guanidinhydrochloridlösung wurde daher vorsichtig gegen mehrere Portionen Natriumbicarbonatlösung (ca. 50 mg/l) und anschließend gegen bidestilliertes Wasser ca. 48 Stunden bei $4^{o}C$ dialysiert. Das CD-Spektrum dieser so erhaltenen Apomyoglobinlösung ist ebenfalls in Abbildung 13 wiedergegeben. Es ist innerhalb der Grenzen der Konzentrationsbestimmung identisch mit dem von unbehandeltem Apomyoglobin.

Apomyoglobin nimmt somit auch nach Lösen aller Wasserstoffbrückenbindungen, nach der Entferung des H-brückenlösenden Agens, seine ursprüngliche Konformation wieder ein. Die Information für die Ausbildung aller Wasserstoffbrücken des Makromoleküls muß also auch in 6 molarer Guanidinhydrochloridlösung erhalten geblieben sein.

Von weiterer Bedeutung war natürlich auch die Rekombination mit Hämin. Durch die oben beschriebene Titrationsmethode (siehe auch Abbildung 12) wurde der Anteil der aktiven Form des so behandelten Proteins quantitativ bestimmt. Es ergibt sich daraus ebenfalls eine Aktivität von 98 - 99 % bezogen auf die von nicht behandeltem Apomyoglobin.

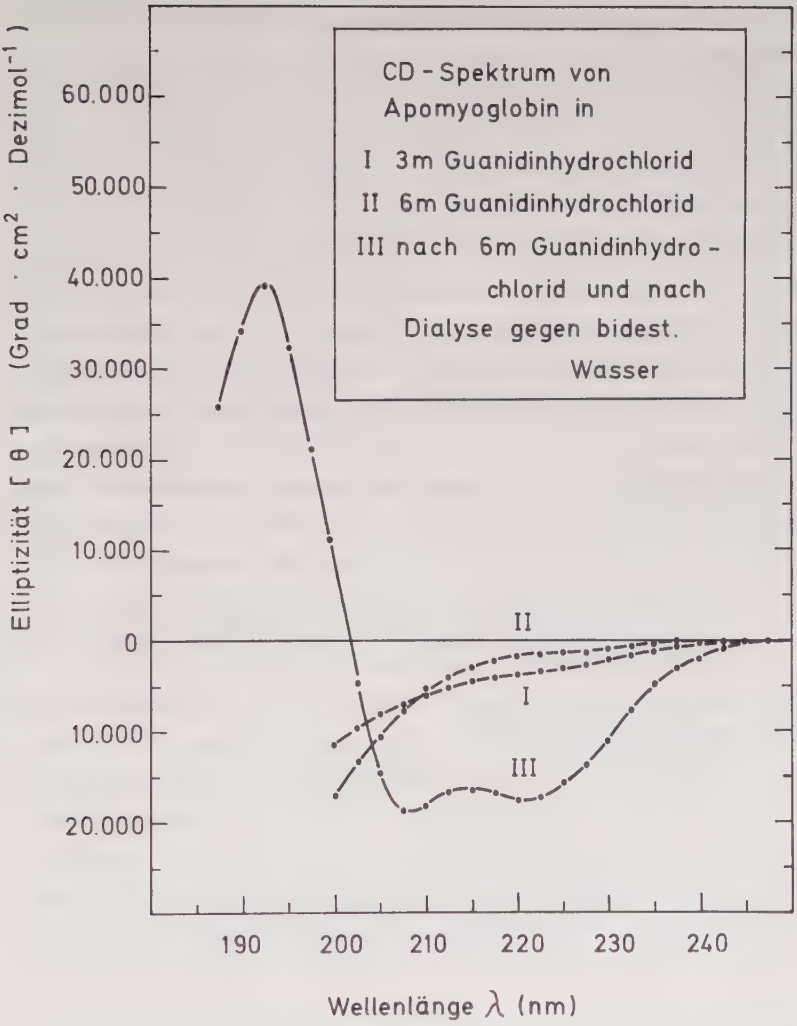


Abb. 15: CD-Spektrum von Apomyoglobin in Guanidinhydrochloridlösung

b) Behandlung von Apomyoglobin mit Natriumdodecylsulfat

Neben den Wasserstoffbrückenbindungen und den Coulomb'schen Anziehungskräften von polaren Seitengruppen sind für die Strukturen höherer Ordnung eines Proteins die nichtpolaren, hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffresten der Seitengruppen von Bedeutung. Die einzelnen Effekte sind zwar relativ schwach (ca. 1 kcal/Mol-Peptidbindung), doch wird durch die große Anzahl entlang der gesamten Polypeptidkette insgesamt eine bedeutende Wirkung erzielt. Besonders im Aktivzentrum von einigen Proteinen wie z. B. Myoglobin, Hämoglobin und Lysozym scheinen stets eine ganze Reihe von hydrophoben Kräften beteiligt zu sein. So wurden auch im Myoglobin in der Nähe der Hämgruppe überwiegend hydrophobe Aminosäuren festgestellt, während die polaren Aminosäuren an der Peripherie des Moleküls sitzen. Da nun die hydrophoben Wechselwirkungen am Aktivzentrum der Hämoproteide eingreifen, sollte untersucht werden, ob es auch möglich ist, diese Wechselwirkungen und schwachen Bindungen aufzuspalten.

Während Guanidinhydrochlorid die Wasserstoffbrücken eines Makromoleküls aufspaltet, tritt bei der Einwirkung von Natriumdodecylsulfat ein anders gearteter Denaturierungsmechanismus ein. Zunächst tritt eine polare Anziehung der kationischen Gruppen des Proteins und der Sulfatseite des Dodecylsulfats ein, und anschließend bildet sich eine hydrophobe Wechselwirkung des Kohlenwasserstoffrests des Dodecylsulfats mit hydrophoben Seitenketten des Proteins aus. Dadurch werden zu weiten Teilen die hydrophoben Wechselwirkungen gelöst. Aus diesem Grunde wurde Apomyoglobin mit steigenden Mengen Natriumdodecylsulfat versetzt.

Bereits geringe Mengen an Dodecylsulfat fällen das Protein jedoch quantitativ aus. In einigen Fällen ist es bekannt, daß sich unter dem Einfluß

von Natriumdodecylsulfat intra- und intermolekulare Faltblattstrukturen ausbilden. Das scheint auch beim Apomyoglobin unter Bildung größerer Mizellen der Fall zu sein.

Um vollständigen Umsatz zu sichern, wurden in einem weiteren Versuch 20 mg Apomyoglobin in 10 ml bidest. Wasser gelöst und so viel Natriumdodecylsulfat zugegeben, daß die Lösung ca. 10%ig war. Das Apoprotein fällt in dieser Lösung sofort aus und ist weder durch Zugabe von Guanidinhydrochlorid noch durch tagelange Dialyse gegen verschiedene Puffersysteme wieder in Lösung zu bringen.

Es ergab sich, daß die große Resistenz gegen Wasserstoffbrückenlösende Agentien des so behandelten Proteins vor allem darauf beruht, daß trotz zehntägiger Dialyse noch größere Mengen an Dodecylsulfat adhäsiv am Protein gebunden bleiben. Um auch diese Mengen noch zu entfernen, wurde die Suspension mit wenig Natriumbicarbonat versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Trennen der Phasen und Zugabe von Guanidinhydrochlorid zur wässrigen Phase ergab sich eine klare Lösung, die zur Entfernung der anorganischen Salze und von Spuren Äther noch 24 Stunden bei $4^{\circ}C$ gegen bidest. Wasser dialysiert wurde.

Diese so behandelte Lösung enthielt noch ca. 5 mg Apomyoglobin, das durch Rekombination mit Hämin getestet wurde. Die quantitative Bestimmung mit Hilfe der Titrationsmethode (wie oben beschrieben) ergab noch eine Aktivität von $26,5 \pm 5,0$ Prozent.

Die Information für den Aufbau der räumlichen Anordnung bleibt somit auch beim Lösen eines großen Teils der polaren und der hydrophoben Wechselwirkungen sowie der Wasserstoffbrücken erhalten. Daß diese Information bereits in der Anordnung der verschiedenen Aminosäuren zur Primärstruktur enthalten ist, erscheint nach diesen Untersuchungen wahrscheinlich.

c) Behandlung von Apomyoglobin mit Trifluoressigsäure und bromwasserstoffhaltiger Trifluoressigsäure

Bei der Festkörperpeptidsynthese nach Merrifield wird das geschützte Peptid durch Behandlung mit HBr/Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten. Außerdem wirden durch Trifluoressigsäure einige Schutzgruppen von ε-Aminogruppen abgespalten. Die Veränderungen, die Apomyoglobin unter dem Einfluß dieser Chemikalien erleidet und die Aktivität gegenüber Hämin nach Entfernen dieser Agentien, wurde im Hinblick auf eine mögliche Totalsynthese des Apomyoglobins untersucht.

100 mg Apomyoglobin wurden 10 Tage im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Davon wurden 30 mg in wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und das CD-Spektrum eines Teils dieser Lösung bestimmt. Die restliche Lösung wurde 45 Minuten stehen gelassen und anschließend die Trifluoressigsäure bis zur Trockne abgezogen. Das Protein wurde dann in Boratpuffer p_H 10,3 , Ionenstärke 0.16 , gelöst und davon das CD-Spektrum und die Rekombinationsfähigkeit gegenüber Hämin gemessen. In einem weiteren, anschließenden Versuch wurde das Protein nach Abziehen der Trifluoressigsäure in 6 molarem Guanidinhydrochlorid gelöst, die Lösung dialysiert und dann CD-Spektrum und Rekombinationsfähigkeit bestimmt.

In beiden Fällen ergab sich aus dem Circulardichroismus und aus der Titration eine Rekombination von über 90 % (TFA behandeltes Protein 98 %, TFA + Guanidinhydrochlorid 95 %). Die Genauigkeit ist jedoch immer durch die Konzentrationsbestimmung festgelegt. Alle prozentualen Angaben sollten daher mit einem Fehler von $\pm$ 5 % betrachtet werden.

Um die Einwirkung von HBr/Trifluoressigsäure auf Apomyoglobin zu untersuchen, wurden weitere 30 mg über P_2O_5 getrocknetes Globin in

wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst. In dieser Lösung wurde 15 Minuten lang bromfreier und getrockneter Bromwasserstoff eingeleitet, und diese Lösung danach noch weitere 30 Minuten stehengelassen. Das Protein wurde anschließend mit absolutem Äther gefällt, abzentrifugiert, mehrmals mit absolutem Äther bis zur Säurefreiheit gewaschen und in 6 molarem Guanidinhydrochlorid gelöst. Nach 48 stündiger Dialyse gegen mehrere Portionen bidest. Wasser ergaben sowohl das CD-Spektrum als auch die Rekombination mit Häm nur noch eine Aktivität von 40 %. Die Proteinlösung war nach dieser Behandlung gelblich gefärbt. Es ist daher wahrscheinlich, daß ein Teil der Tryptophanreste im Molekül angegriffen wurde, was ja schon durch geringe Feuchtigkeitsspuren in der Trifluoressigsäure der Fall sein kann.

d) Apomyoglobin in organischen Lösungsmitteln

Für die Totalsynthese von Apomyoglobin ist natürlich auch das Verhalten in organischen Lösungsmitteln interessant. In einer Mischung aus Eisessig und Methanol nahm der Helixgehalt des Proteins um etwa 10 % zu. Sowohl in Alkoholen als auch in 6 molarer Essigsäure wurden an verschiedenen Proteinen schon Zunahmen des Helixanteils beobachtet. So ist es nicht weiter verwunderlich, wenn in einer Mischung dieser beiden helixfördernden Solventien ebenfalls eine Zunahme des Helixanteils beobachtet wird.

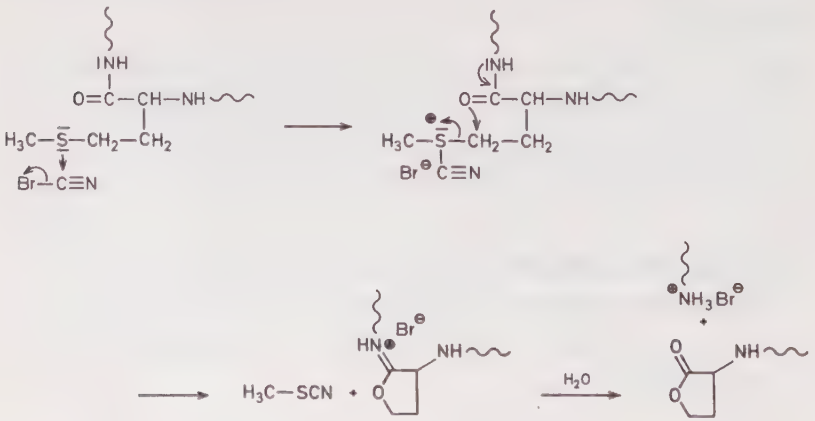
Dimethylformamid ist ein besonders geeignetes und häufig angewandtes Lösungsmittel bei der Peptidsynthese an fester Phase. Daher sollte auch noch das Verhalten von Apomyoglobin darin untersucht werden. Die Löslichkeit des "nativen" Proteins in Dimethylformamid ist jedoch zu gering. Vermutlich lösen sich nur geringe Mengen in den anwesenden Spuren Wasser. Das in Dimethylformamid unlösliche Protein wurde in wässrigem 6 m Guanidinhydrochlorid gelöst und davon nach Dialyse die Aktivität gemessen. Mit ca. 90 % lag diese nur geringfügig unter der des unbehandelten Proteins.

VI. Selektive Spaltung von Apomyoglobin mit Bromcyan und Untersuchung der Rekombinationsfähigkeit der erhaltenen Bruchstücke

Apomyoglobin baut, wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt wurde, die "native" räumliche Anordnung aller Atome auch nach der Zerstörung der nicht kovalenten Bindungen (Wasserstoffbrücken und polare sowie hydrophobe Wechselwirkungen) wieder auf. Da die Information für die Strukturen höherer Ordnung somit vermutlich schon in der Primärstruktur liegt, schien es auch interessant zu sein, zu untersuchen, ob auch Teile der Sequenz noch genügend Informationen enthalten, um eine Konformation einzunehmen, die es ermöglicht die Hämgruppe einzubauen.

Da dafür die Tertiärstruktur wohl die dominierende Rolle spielt, wie aus Abbildung 1 hervorgeht, genügt es nicht, nur die Sekundärstruktur von Bruchstücken mit Hilfe des Circulardichroismus zu untersuchen wie es von R. M. EPAND und H. A. SCHERAGA [43] durchgeführt wurde. Es muß vielmehr vor allem auch auf die Untersuchung der Rekombinationsfähigkeit der Bruchstücke mit der Hämgruppe Wert gelegt werden.

Nach den Arbeiten von E. GROSS und B. WITKOP [44] lassen sich Proteine selektiv am Carboxylende von Methionin durch Einwirkung von Bromcyan in saurer Lösung spalten.



Apomyoglobin enthält in der Sequenz zwei Methioninreste. Bei der Spaltung mit Bromcyan werden so nur drei relativ große Bruchstücke erhalten. Daher wurde auch diese Methode von A. B. EDMUNDSON [45] bei der Sequenzaufklärung des Pottwalmyoglobins mitbenutzt.

Zur Darstellung der Bruchstücke wurde anfänglich Apomyoglobin in der von A. B. EDMUNDSON angegebenen Weise mit Bromcyan versetzt und die Bruchstücke durch Gelfiltration über Sephadex verschiedener Porenweiten getrennt. Die Ausbeuten sind jedoch verhältnismäßig gering, und große Mengen an nicht umgesetztem Apomyoglobin erschweren die Reinigung der Bruchstücke.

Da auch größere Überschüsse an Bromcyan die Ausbeuten nicht merklich steigerten, wurde angenommen, daß der Angriff des Bromcyans an den Methioninseitenketten durch die Konformation des Apo-Proteins aus sterischen Gründen erschwert wird. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Versuchen die Reaktion in 8 molarer Harnstofflösung und bei erhöhter Säurekonzentration durchgeführt um die Sekundär und die Tertiärstruktur aufzulösen. Die Ausbeute wird dadurch bedeutend erhöht; vor allem aber sind nur noch geringe Mengen an intaktem Apomyoglobin festzustellen. Kleinere Peptide, die durch die erhöhte Säurekonzentration in verstärktem Maß entstanden waren, ließen sich leicht durch Gelfiltration über Sephadex G 25 abtrennen.

Nach mehrmaliger Gelfiltration über Sephadex verschiedener Porenweiten ergaben sich drei Proteine (I - III), deren Aminosäurezusammensetzungen den Teilsequenzen 1 - 55 (I), 56 - 131 (II) und 132 - 153 (III) des Pottwalmyoglobins sehr genau entsprachen (siehe Experimenteller Teil).

Aus Abbildung 1 ergibt sich im Zentrum des Proteins eine taschenförmige Ausbuchtung, in der - an den beiden Histidinresten 64 und 93

fixiert - die Hämgruppe eingebaut wird. Fast alle Aminosäuren dieser Tasche sind im Bruchstück II erhalten geblieben. Daher sollte dieses Teilstück zunächst auf Rekombinationsfähigkeit untersucht werden.

Dazu wurde das Protein in Boratpuffer p_H 10, 3 der Ionenstärke 0, 16 gelöst und von dieser Lösung jeweils 0, 1 ml zu 5 ml des selben Puffers gegeben. Zu diesen Lösungen wurden steigende Mengen einer eingestellten Häminlösung in der bereits beschriebenen Weise zugegeben und die Extinktion bei 408 nm gemessen. Innerhalb der Genauigkeit der verwendeten Methode konnte dabei keinerlei Wechselwirkung des Proteins mit der zugegebenen Häminmenge - entsprechend der des Apomyoglobins - festgestellt werden.

Die Aminosäurereste 56 - 131 der Myoglobinsequenz enthalten somit nicht genügend Information, um die Hämgruppe einzubauen, obwohl nach der Röntgenstrukturanalyse vor allem diese den direkten Kontakt zur prostetischen Gruppe haben.

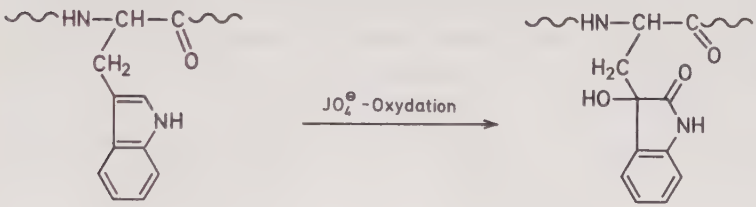
C. B. ANFINSEN und Mitarbeiter [16] konnten zeigen, daß Bruchstückgemische der Ribonuklease, die aus enzymatischen Spaltungsreaktionen erhalten wurden, die biologische Aktivität der Ribonuklease ergeben, wenn die gesamte Sequenz - oder große Teile davon - summarisch vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde die Rekombinationsfähigkeit eines Gemisches aus äquimolaren Mengen der Bruchstücke I, II und III mit der angegebenen Methode bestimmt. Es konnte jedoch auch hier keine Rekombination festgestellt werden.

Die einzelnen, durch Bromcyan-Spaltung aus Apomyoglobin erhaltenen Bruchstücke und das Gemisch aus diesen enthalten also nicht genügend Information, um die Hämgruppe entsprechend der Anordnung im Metmyoglobin einzubauen. Da bei der Bromcyanspaltung die Methioninreste in Homoserinreste (siehe Formel II) umgewandelt werden, könnte die

Inaktivität durch diesen Austausch verursacht worden sein. Zumal auch von R. CECIL [46] aus evolutionstheoretischen Überlegungen vermutet wird, daß die beiden Methioninreste in Myoglobin essentiell sein könnten.

VII. Rekombinationsfähigkeit des mit Kaliumperjodat oxydierten Apomyoglobins

Die beiden Tryptophanreste in Apomyoglobin werden von Perjodat in 0,1 m Acetatpuffer vom p_H 5,0 entsprechend Formelschema III oxydiert [47].



III

Gleichzeitig werden auch die Seitenketten der Methioninreste zum Sulfoxid aufoxydiert. Für die Frage, ob die beiden Methioninreste für den Einbau des Häms wichtig sind, ist daher die Untersuchung der Rekombinationsfähigkeit des mit Perjodat oxydierten Apomyoglobins wichtig.

Zu Lösungen von oxydiertem Protein wurden in der angegebenen Weise Hämin zugegeben und entsprechend Abbildung 12 die Rekombinationsfähigkeit bestimmt. Es ergab sich jedoch, daß dieses so behandelte Protein - innerhalb der Genauigkeit der verwendeten Methode - Häm nicht mehr einbaut. Die Vermutung, daß Methionin für die Aktivität von Apo-Myoglobin essentiell sein könnte, wird auf diese Weise untermauert.

C) Experimenteller Teil

I. Messung des Circulardichroismus

Für die Aufnahme der CD-Spektren stand ein "DICHROGRAPH II" der Firma JOUAN - RUSSEL zur Verfügung. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde Epiandrosteron, das von der Herstellerfirma zu diesem Zweck mitgeliefert wurde und d-(+)- Campfersulfonsäure verwendet.

Alle Daten sind in molaren Elliptizitäten, bezogen auf das mittlere Molekulargewicht eines Aminosäurerestes, in Grad · cm^2 · $Dezimol^{-1}$ angegeben. Für die mittleren Molekulargewichte wurden für Poly-L-Glutaminsäure 129, für Poly-L-Lysin 127 und für Myoglobin 112,5 angenommen. Für Clostridienferredoxin ergibt sich ein mittleres Molekulargewicht von 109, für Clostridienapoferredoxin von 100 und für Spinat- und Spinatapoferredoxin ein solches von 115 bzw. von 113,5.

Die mittleren molaren Elliptizitäten $[\theta]$ sind durch die Gleichung

$$[\theta] = 2{,}303 \cdot \frac{4\,500}{\pi} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \approx 3\,300 \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R)$$

definiert, wo ε_L und ε_R die molaren Extinktionskoeffizienten für links und rechtspolarisiertes Licht bezogen auf das mittlere Molekulargewicht pro Aminosäurerest sind.

Alle Spektren wurden bei einer Zeitkonstanten von 2 und dem langsamsten Wellenlängenvorschub aufgenommen. In allen Fällen wurden Küvetten aus Suprasil (Hellma und Opticell) von 0,001 cm - 0,1 cm Schichtdicke verwendet. Die Aufnahme des CD-Spektrums einer Probe und die Messung der entsprechenden Basislinie erfolgte stets in der gleichen Küvette mit dem entsprechenden Lösungsmittel.

Im Text angegebene Daten über den Circulardichroismus von bestimmten Substanzen und wiedergegebene CD-Kurven sind Mittelwerte aus mindestens 3, im allgemeinen aber 5 - 10 verschiedenen Messungen.

II. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteine und der Poly - α - L - Aminosäuren wurden je nach Art und Menge der einzelnen Substanzen verschiedene Methoden angewendet.

Die Konzentration der Poly- α-L-Aminosäuren wurde vor allem durch Trockengewichtseinwaage bestimmt. Ein Teil der Probenlösung wurde ausgiebig gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, um eventuell vorhandene Salzmengen zu entfernen. Von dieser so behandelten Lösung wurde ein bestimmter Teil gefriergetrocknet und noch mehrere Tage im Hochvakuum über P_2O_5 nachgetrocknet. Die so behandelte Proteinmenge wurde dann mit einer Mikrowaage auf $0,1_1$ mg genau gewogen.

Zur Überprüfung dieser Werte wurden auch die Stickstoffgehalte der entsprechenden Probelösungen in einer Variation der von C. A. LANG [20] beschriebenen Methode bestimmt.

Zu 0,1 - 1 ml der Probelösung in Reagensgläsern wurden 0,5 ml konzentrierte Schwefelsäure und ca. 50 mg Selenreaktionsgemisch (E. Merck Darmstadt) gegeben. Gleichzeitig wurden zu steigenden Mengen Ammoniumsulfat die gleichen Reagentien zugegeben. Alle Reagensgläser wurden 3 Stunden auf ca. 300 ^{o}C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 10 ml bidest. Wasser zugegeben, von der verdünnten Lösung 0,5 ml entnommen, und diese ebenfalls mit 10 ml Wasser verdünnt. Zugabe von 1 ml einer frisch zubereiteten Lösung Neßlers-Reagens (E. Merck Darmstadt) ergab eine orangegelb gefärbte Lösung, deren Extinktion bei 420 nm nach halbstündigem Stehenlassen im Dunkeln gemessen wurde.

Durch Vergleich der Extinktionswerte der Probelösungen mit der gleichzeitig aufgenommenen Eichkurve ergab sich der gesuchte Stickstoffgehalt, aus dem dann die entsprechende Konzentration berechnet wurde. Die genaue Bestimmung der Eichkurve unter den jeweiligen Bedingungen war notwendig, da für die verschiedenen Messungen von Bestimmung zu Bestimmung immer verschiedene Extinktionen, auch für die Eichwerte, erhalten wurden.

Die Konzentration von Pottwalmetmyoglobin und von Pottwalapomyoglobin wurde durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt (Zeiss PMQ II). Die in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten wurden durch die Stickstoffbestimmung überprüft. Für Metmyoglobin ergibt sich so ein Wert von $3,50 \cdot 10^4$, während für Apomyoglobin $1,59 \cdot 10^4$ am genauesten erscheint.

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Ferredoxine wurde ebenfalls die optische Dichte bei den Wellenlängen gemessen, bei denen der molare Extinktionskoeffizient bekannt ist. Die Konzentrationen wurden dann aus folgenden Extinktionskoeffizienten bestimmt: Clostridienferredoxin $\varepsilon_{390nm} = 2,1 \cdot 10^4$ [48], Clostridienapoferredoxin $\varepsilon_{280nm} = 1,725 \cdot 10^3$ [48], Spinatferredoxin $\varepsilon_{420nm} = 8,8 \cdot 10^3$ [49] und Spinatapoferredoxin $\varepsilon_{276nm} = 1,56 \cdot 10^4$ [49].

III. Darstellung von Pottwal-Apomyoglobin aus Pottwalmetmyoglobin

1 g handelsübliches Pottwalmetmyoglobin (Pierce Chemical Comp.) wurde in 30 ml bidestilliertem Wasser gelöst und durch zweimalige Gelfiltration über Sephadex G 75 gereinigt. Nach diesen Reinigungsschritten wurden ungefähr 800 mg Metmyoglobin (ca. 10 mg/ml) mit einem Extinktionsverhältnis E_{408nm}/E_{280nm} von 5,31 - 5,32 (in Ausnahme-

fällen 5, 35) erhalten. Die nach Chromatographie an Sephadex G 75 erhaltene Lösung wurde auf $0^{o}C$ gekühlt, durch vorsichtige Zugabe von 1 n HCL auf p_H 1, 45 - 1, 50 eingestellt, vier bis fünf Stunden stehengelassen und dann bei $4^{o}C$ dreimal mit gleichen Portionen frisch destilliertem und auf $0^{o}C$ gekühltem Methyläthylketon ausgeschüttelt.

Die so erhaltene, noch leicht braunstichige wässrige Phase wurde am Hochvakuumrotationsverdampfer eingeengt, nochmals mit HCl auf p_H 1, 4 eingestellt und zur Vollständigkeit der Häminabspaltung nochmals mit Methyläthylketon extrahiert. Spuren von in Wasser gelöstem Methyläthylketon wurden anschließend im Hochvakuum abgezogen.

Die so erhaltene, fast farblose Lösung wurde zunächst drei Tage gegen mehrere Portionen Natriumhydrogencarbonatlösung (50 mg/Liter), dann zwei Tage gegen mehrere Portionen einer 0, 01 %-igen EDTA-Lösung und dann noch erschöpfend gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Alle Dialysenschritte wurden in der Kühlzelle bei $4^{o}C$ vorgenommen.

Die auf diese Weise erhaltenen Apomyoglobinlösungen enthielten in allen Aufarbeitungen nur noch sehr geringe Beimengungen an nicht umgesetztem Metmyoglobin (0, 3 - 0, 5 %), während mit der ursprünglich beschriebenen Methode die Hämgruppe in allen Fällen nur zu 95 % entfernt werden konnte. Die Rekombinationsfähigkeit dieser so erhaltenen Globinlösungen lag stets - innerhalb der Meßgenauigkeit - bei 100 %.

IV. Bromcyanspaltung von Apomyoglobin

300 mg Apomyoglobin wurden in 8 molarem Harnstoff gelöst. Die Lösung wurde durch Zugabe von halbkonzentrierter Salzsäure ca. 1 molar an HCl gemacht und nach Zugabe von 3 g Bromcyan mehrere Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Die niedermolekularen Beimengungen wurden danach durch Dialyse gegen mehrere Portionen bidest. Wasser zum größten Teil entfernt und eventuell übriggebliebene, flüchtige Verunreinigungen durch Gefriertrocknung am Hochvakuum abgezogen.

Das so erhaltene Peptidgemisch wurde in 0,2 molarer Essigsäure gelöst und zunächst durch Gelfiltration über Sephadex G 25 (2,5 · 90 cm Säule) grob getrennt. Der größte Teil, der durch unspezifische Hydrolysen entstandenen kleineren Peptide, wurde so von den gesuchten Fraktionen abgetrennt.

Diese wurden durch erneute Gelfiltration zunächst über Sephadex G 75 (2,5 · 140 cm Säule), dann über Sephadex G 50 (2,5 · 90 cm) und nochmals über Sephadex G 75 (2,5 · 140 cm) so lange gereinigt, bis die Aminosäureanalysen (siehe Tabelle II) reine Produkte anzeigten.

Die so erhaltenen Bruchstücke wurden gefriergetrocknet und für die Untersuchungen der Rekombinationsfähigkeit gegenüber Hämin verwendet.

Tabelle II: Aminosäureanalysen von Apomyoglobinbruchstücken nach Bromcyanspaltung

	Bruchstück I		II		III	
	gef.	theor.	gef.	theor.	gef.	theor.
Lysin	6,50	5	10,4	10	4,15	4
Histidin	5,11	4	7,98	8	0,10	-
Arginin	1,92	2	1,58	1	1,08	1
Asparaginsäure	3,00	3	2,64	3	0,78	2
Threonin	2,11	2	2,86	3	-	-
Serin	2,00	2	4,45	4	0,12	-
Glutaninsäure	8,56	9	7,16	7	3,09	3
Prolin	1,58	1	6,25	3	-	-
Glycin	4,08	3	7,21	6	2,11	2
Alanin	4,89	4	11,55	10	3,38	3
Cystein	-	-	-	-	-	-
Valin	4,72	5	2,67	3	-	-
Methionin	-	-	-	-	-	-
Isoleucin	2,90	2	6,00	6	1,11	1
Leucin	6,35	7	7,95	8	2,95	3
Tyrosin	0,37	-	1,12	1	1,71	2
Phenylalanin	3,00	3	2,11	2	1,04	1
Homoserin	n.b.	1	n.b.	1	n.b.	-

Bruchstück I = Aminosäuren 1 - 55 der Myoglobinsequenz
Bruchstück II = " 56 - 131 " "
Bruchstück III = " 132 - 153 " "

n.b. = nicht bestimmt

V. Isolierung von Ferredoxinen

a) Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum

Clostridium pasteurianum - Zellen wurden nach der von J. E. CARNAHAN und Mitarbeiter [50] beschriebenen Methode unter Zusatz von Ammoniumsulfat gezüchtet [+].

Die aus einem 100 l Ansatz gewonnenen Zellen wurden in ca. 5 l Wasser suspensiert und in Portionen von 200 ml 30 Minuten lang durch Ultraschallbehandlung (Sonifier B - 12, Branson Co.) aufgeschlossen. Dabei wurde die Temperatur stets unter 10°C gehalten. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde bei 0 - 3°C durchgeführt. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 20 000 U/Min. wurden die Überstände gesammelt und dazu genügend DEAE-Cellulose (Whatman DE 52) gegeben, um das gesamte Ferredoxin zu adsorbieren. Die DEAE-Cellulose wurde von feinkörnigen Zellresten und anderen Verunreinigungen durch Filtration und mehrmaliges Waschen mit Wasser und 0,2 m Acetatpuffer p_H 7,4 befreit und anschließend in eine Säule (7 cm Durchmesser) gegeben. Das Clostridienferredoxin wurde mit 1 m Acetatpuffer p_H 7,4 eluiert und in mehreren Portionen über eine Sephadex G 50 Säule (100 x 2,5 cm) mit 0,2 molarem Acetatpuffer als Laufmittel chromatographiert. Die ferredoxinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und nochmals an DEAE-Cellulose (3 x 2 cm Säule) durch Waschen mit 0,2 m Acetatpuffer gereinigt. Nach Eluation mit 1 m Acetatpuffer und nochmaliger Gelfiltration über Sephadex G 50 wurde das Ferredoxin durch Chromatographie an Sephadex G 25 mit Wasser

---

[+] An dieser Stelle möchte ich Herrn Dipl.-Chemiker Günther Gassmann sehr herzlich für seine Hilfe bei der Züchtung der Bakterien danken.

als Laufmittel entsalzt. Dieses so gereinigte Ferredoxin zeigt ein Extinktionsverhältnis E_{390nm}/E_{285nm} von 0,8 und wurde für die Aufnahme des CD-Spektrums verwendet.

b) Ferredoxin aus Spinat

Spinatferredoxin wurde von D. JOSEF [49] nach der von E. BAYER und Mitarbeiter [48, 49, 51] beschriebenen Methode aus dem Rohsaft von 20 kg Spinat isoliert und gereinigt.

Zur Aufnahme des CD-Spektrums wurde sowohl über DEAE-Cellulose und Sephadex G 50 gerinigtes Spinatferredoxin mit einem Extinktionsverhältnis E_{420nm}/E_{276nm} von 0,41 als auch doppelt resynthetisiertes Spinatferredoxin verwendet. Die CD-Spektren der beiden Ferredoxine sind innerhalb der Genauigkeit der Messung des Circulardichroismus und der Konzentrationsbestimmung des Proteins identisch.

VI. Darstellung von Apoferredoxinen

a) Aus Clostridienferredoxin

Eisen und labiler Schwefel wurden aus intaktem Clostridienferredoxin durch Behandlung mit α, α'-Dipyridyl nach der Methode von E. BAYER und Mitarbeiter [52] sowie mit Trichloressigsäure abgespalten, wie es von J. HONG und J. C. RABINOWITZ [53] beschrieben wurde.

1. Abspaltung mit Trichloressigsäure

Zu 100 mg Ferredoxin in 100 ml 0,2 m Acetatpuffer p_H 7,4 wurde unter Stickstoff solange eine 20 %-ige Trichloressigsäure-Lösung zugetropft, bis die Reaktionslösung 5 %-ig an Trichloressigsäure war. Nach ca. 5 Stunden wurde das ausgefallene Protein bei 10 000 U/Min. abzentrifugiert, mit 5 %-iger Trichloressigsäurelösung gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 10 ml Tris-HCl-Puffer p_H 8,6 gelöst. Durch Gelfiltration an Sephadex G 50 (100 x 2,5 cm Säule, Laufmittel: Wasser) wurde es gereinigt. Das so erhaltene Apoferredoxin wurde gefriergetrocknet und bei - 30°C aufbewahrt. Zur Aufnahme der CD-Spektren wurde es wieder in bidestilliertem Wasser gelöst, von eventuell ungelösten Bestandteilen abzentrifugiert und bei Zimmertemperatur gemessen.

2. Abspaltung mit α, α'-Dipyridyl

100 mg Clostridienferredoxin in 100 ml 0,2 m Acetatpuffer p_H 7,4 wurden solange mit α, α'-Dipyridyl-Lösung versetzt, bis die Reaktionslösung ca. 0,5 %-ig an Dipyridyl war. Diese Lösung wurde bei 4°C mehrere Tage stehen gelassen, zur Entfernung des Eisen- α,α'-Dipyridylkomplexes über Chelex 100 (Biorad. Lab.) gegeben und durch Gefriertrocknung eingeengt.

Da bei der Aufarbeitung nicht auf Sauerstoffreiheit geachtet wurde, wurden bei der Chromatographie an Sephadex G 50 mehrere proteinhaltige und auch resynthesefähige Fraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht erhalten. Diese Fraktionen wurden durch Gefriertrocknung eingeengt und durch weitere Gelfiltration an verschiedenen Porenweiten Sephadex gereinigt. Mit der Ultrazentrifuge wurden

für die verschiedenen Fraktionen Molekulargewicht von 5.567, 10.438 und 16.440 bestimmt [+].

Es wird daher angenommen, daß bei der Abspaltung des Eisens und des labilen Schwefels unter leicht oxydierenden Bedingungen (Luftsauerstoff) ein Teil des monomeren Apoferredoxins unter Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zu dimeren und trimeren Gebilden aggregiert. Von allen drei Apoferredoxinen wurden die entsprechenden CD-Spektren aufgenommen. Sie unterscheiden sich allerdings untereinander und von dem des TCA-Apoferredoxins nur geringfügig.

b) Aus Spinatferredoxin

Die Spinatapoferredoxine wurden von D. JOSEF durch Abspaltung von Eisen und labilem Schwefel aus Spinatferredoxin mit α, α'-Dipyridyl-Trichloressigsäure, p-Chlor-Mercuribenzoat und Triphenylphosphin erhalten und durch Gelfiltration an Sephadex G 50 gereinigt. Die CD-Spektren der verschiedenen Apoferredoxine aus Spinatferredoxin unterscheiden sich nur geringfügig. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 12 angegeben.

[+] Herrn Bachowsky vom Max-Planck-Institut für Virusforschung danke ich herzlich für die Durchführung der Molekulargewichtsbestimmungen.

D) Zusammenfassung

Zur Bestimmung der räumlichen Anordnung von Proteinen in Lösung mit Hilfe des Circulardichroismus wurde ein neues Verfahren entwickelt. Durch Kombination verschieden großer Anteile an α-Helix, Random coil und β-Struktur, die aus Modellsubstanzen ermittelt wurden, konnte eine Anzahl Kurvenscharen erhalten werden, die durch Vergleich mit den gemessenen CD-Spektren von Proteinen die gesuchten prozentualen Werte der Sekundärstruktur ergeben.

Die Methode wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Pottwalmetmyoglobin angewendet. Die Übereinstimmung des gemessenen und des berechneten CD-Spektrums ist außerordentlich gut. Die erhaltenen Werte für die Sekundärstruktur mit 70 % α-Helix und 30 % Random coil entsprechen wesentlich besser den röntgenographischen Daten als die früher aus unvollständigen CD-Spektren ermittelten Werte.

Die CD-Spektren von Pottwal-Apomyoglobin, Clostridienferredoxin, Clostridien-Apoferredoxin, Spinatferredoxin und Spinat-Apoferredoxin wurden erstmals im gesamten erforderlichen Spektralbereich aufgenommen und daraus mit Hilfe der angegebenen Methode die Sekundärstruktur bestimmt. Für Pottwal-Apomyoglobin ergibt sich so ein Wert von 50 % α-Helix und 50 % Random coil; für Clostridienferredoxin, dessen Apoprotein und Spinatapoferredoxin von 10 % α-Helix, 20 % β-Struktur und 70 % Random coil und für Spinatferredoxin von 30 % α-Helix, 20 % β-Struktur und 50 % Random coil.

Eine mögliche Strukturermittlung mit Hilfe der ^{19}F-Kernresonanzmessung von trifluoracetylierten Proteinen wurde diskutiert. Das CD-Spektrum von trifluoracetyliertem Poly-L-Lysin wurde dazu mit dem

^{19}F-Kernresonanzspektrum verglichen. Die relativ geringe Halbwertsbreite des entsprechenden Fluorsignals deutet auf eine ähnliche Umgebung aller Fluoratome hin, was nur in einer geordneten Struktur möglich ist.

Durch Einwirkung von verschieden wirkenden Denaturierungsmitteln auf Apomyoglobin wurde die Stabilität, Denaturierung und Renaturierung des Proteins untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse unterstützen die Theorie, daß alle Information hinsichtlich der räumlichen Anordnung von Proteinen bereits in der Primärstruktur enthalten ist. Der größte Teil der intakten Sequenz scheint jedoch erforderlich zu sein, denn Bruchstücke der Sequenz, die durch Bromcyanspaltung erhalten wurden, ergaben keine Rekombination mit Hämin. Ebenso zeigt am Tryptophan und Methionin oxydiertes Apomyoglobin keinerlei Rekombinationsfähigkeit. Zumindest Methionin scheint daher essentiell für den Einbau der Hämgruppe in das Apoprotein zu sein.

E. Literaturverzeichnis

1) J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff und D. C. Phillips, Nature 181, 662 (1958)

2) J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips und V. C. Shore, Nature 185, 422 (1960)

3) J. C. Kendrew, H. C. Watson, B. E. Strandberg, R. E. Dickerson, D. C. Phillips und V. C. Shore, Nature 190, 666 (1961)

4) J. C. Kendrew, Science 139, 1259 (1963)

5) L. Pauling und R. B. Corey, Proc. Nat. Acad. Sci. US 37, 235 (1951)

6) L. Pauling und R. B. Corey, Proc. Roy. Soc. London B. 141, 21 (1953)

7) P. Urnes und P. Doty, Advances in Protein Chem. 16, 401 (1961)

8) G. Holzwarth, W. B. Gratzer und P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 84, 3194 (1962)

9) S. C. Harrison und E. R. Blout, J. Biol. Chem. 240, 299 (1965)

10) E. Breslow, S. Beychok, K. D. Hardman und F. R. N. Gurd, J. Biol. Chem. 240, 304 (1965)

11) B. Askonas, J. A. V. Butler, F. Jacob, D. C. Phillips, L. Sachs und G. V. Sherbet, Nature 208, 1048 (1965)

12) G. Nemethy, D. C. Phillips, S. J. Leach und H. A. Scheraga, Nature 214, 363 (1967)

13) B. Jirgensons, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Makromolekules S. 59, 60 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)

14) W. B. Gratzer und D. A. Cowburn, Nature 222, 426 (1969)

15) C. B. Anfinsen und E. Haber, J. Biol. Chem. 236, 1361 (1961)

16) I. Kato und C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 244, 1004 (1969)

17) J. H. Straus, A. S. Gordon und D. F. H. Wallach, European J. Biochem. 11, 201 (1969)

18) J. A. Schellman und C. Schellman in H. Neurath Ed., The Proteins; Composition, Structure and Funktion, 2nd. ed., Vol. II p. 22 Academic Press New York and London (1964)

19) G. Holzwarth und P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 87, 218 (1965)

20) C. A. Lang, Analytical Chem. 30, 1692 (1958)

21) L. Rosenfeld, Z. Physik 52, 161 (1928)

22) E. Hückel, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 50, 13 (1944)

23) D. L. Peterson und W. T. Simpson, J. Am. Chem. Soc. 79, 2375 (1957)

24) C. Tanford, Abstracts, 7th Internat. Congress of Biochem.; Tokyo, Symp. I 3, 5, p. 33 (1967)

25) P. K. Sakar und P. Doty, Proc. Nat. Acad. Sci. US 55, 981 (1966)

26) R. Townend, T. F. Kumosinski, S. N. Timasheff, G. D. Fasman und B. Davidson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 163 (1966)

27) N. Greenfield, B. Davidson und G. D. Fasman, Biochemistry 6, 1630 (1967)

28) F. W. J. Teale, Biochim. et Biophys. Acta 35 , 543 (1959)

29) E. Breslow, J. Biol. Chem. 239 , 486 (1964)

30) R. D. Gillard, E. D. McKenzie, R. Mason, S. G. Mayhew, J. L. Peel und J. E. Strangroom, Nature 208 , 769 (1965)

31) N. M. Atherton, K. Garbett, R. D. Gillard, R. Mason, S. J. Mayhew, J. L. Peel und J. E. Strangroom, Nature 212 , 590 (1966)

32) K. Garbett, R. D. Gillard, P. F. Knowles und J. E. Strangroom, Nature 215 , 824 (1967)

33) G. Schneider, Diplomarbeit, Tübingen (1968)

34) E. M. Bradbury, C. Crane-Robinson, H. Goldman und H. W. E. Rattle, Nature 217, 812 (1968)

35) R. Schulman, Nature 225 , 1041 (1970)

36) C. Johnson, Proc. Nat. Acad. Sci. US 64, 1269 (1969)

37) P. Hunziker, Diplomarbeit, Tübingen (1969)

38) R. E. Sievers, E. Bayer und P. Hunziker, Nature 233 , 179 (1969)

39) E. Bayer, G. Jung und W. König, Z. Naturforsch. 22b, 924 (1967)

40) R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 , 2149 (1963)

41) E. Bayer, Chemie f. Labor und Betrieb 20, 3 (1969)

42) F. J. Castellino und R. Barker, Biochemistry 7 , 4135 (1968)

43) R. M. Epand und H. A. Scheraga, Biochemistry 7 , 2864 (1968)

44) E. Gross und B. Witkop, J. Biol. Chem. 237, 1856 (1962)

45) A. B. Edmundson, Nature 198 , 354 (1963)

46) R. Cecil in H. Neurath Ed., The Proteins, Composition, Structure und Funktion, 2nd. ed., Vol. I p. 465 Academic Press New York and London (1964)

47) M. Z. Atassi, Arch. Biochem. Biophys. 120, 56 (1967)

48) E. Bayer, H. Eckstein, H. Hagenmaier, D. Josef, J. Koch, A. Röder und P. Schretzmann, European J. Biochem. 8 , 33 (1969)

49) D. Josef, Dissertation, Tübingen (1969)

50) J. E. Carnahan, L. E. Mortenson, H. F. Mower und J. E. Castle, Biochim. Biophys. Acta 44 , 520 (1960)

51) E. Bayer und D. Josef, im Druck, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.

52) E. Bayer, W. Parr, und B. Kazmaier, Arch. Pharm. 298 , 196 (1965)

53) J. Hong und J. C. Rabinowitz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 , 246 (1967)

Lebenslauf

Am 24. März 1944 wurde ich als Sohn des Bankdirektors Peter Schneider und seiner Ehefrau Emma geb. Greiner in Laichingen Krs. Münsingen geboren.

Nach dem Umzug meiner Eltern in die Kreisstadt Münsingen trat ich in die dortige Volksschule ein und besuchte anschließend das sechsklassige Progymnasium. 1963 legte ich am Gymnasium Metzingen das Abitur ab.

Im Sommersemester 1963 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Tübingen. Im 6. Semester legte ich die Vorprüfung zur Diplomhauptprüfung ab, im 10. Semester bestand ich diese selbst.

Hieran schloß sich von Dezember 1967 bis April 1968 die experimentelle Diplomarbeit und von Mai 1968 bis Februar 1970 die vorliegende Doktorarbeit an. Beide wurden unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

E. BAYER, W. BUES, M. HANACK, G. KORTÜM, H. KRÜGER, H. MAUSER, Eu. MÜLLER, G. OPITZ, W. RÜDORFF, H. SUHR, H. G. TRIESCHMANN.